

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung
DE 101 02 977.2
über die Einreichung einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 02 977.2

Anmeldetag: 23. Januar 2001

Anmelder/Inhaber: Professor Dr. Thomas Jentsch,
20146 Hamburg/DE

Bezeichnung: Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika,
insbesondere von Wirkstoffen zur Behandlung von
Osteoporose

IPC: C 07 H 21/00, C 07 K 14/705, C 12 N 5/16,
C 12 Q 1/68, A 61 K 45/00, A 61 P 25/00,
A 61 P 19/10

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der am
23. Januar 2001 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung, hinterlegt
mit dem Prioritätsbeleg vom 06. Februar 2002 bei der World Intellectual Pro-
perty Organization.

München, den 31. März 2009
Deutsches Patent- und Markenamt
Die Präsidentin

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Riester".

Riester

UEXKÜLL & STOLBERG
PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Prof. Dr. Thomas Jentsch
Laufgraben 33
20146 Hamburg

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT von HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DIPL.-ING. LARS MANKE
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSEN
DR. ALBRECHT von MENGES

RECHTSANWALT
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEY
DR. FRANK DETTMANN

23. Januar 2001
(P 56405 WE/aw)

Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika, insbesondere
von Wirkstoffen zur Behandlung von Osteoporose

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem zur Identifizierung und zum Testen von Wirkstoffen, die auf die synaptische Transmission wirken (Wirkstoffe zur Behandlung neuronaler Erkrankungen), die die Endo-/Exozytose beeinflussen, die die Prozessierung von Proteinen beeinflussen und insbesondere von Wirkstoffen, die zur Behandlung der Osteoporose oder des Morbus Paget, zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka verwendet werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein nicht-menschlicher Säuger, vorzugsweise ein Nager, bei dem ein oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nicht-funktionell exprimiert werden, sowie somatische Zelllinien, die beispielsweise von einem solchen Tier abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Chloridkanäle, insbesondere ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder

ClC-7, in ihrer Aktivität zu beeinflussen, insbesondere zu inhibieren oder zu aktivieren.

Die Osteoporose stellt eine Erkrankung dar, bei der es zum verstärkten Abbau von Knochen kommt, der zur Fragilität führt. Osteoporose ist bei älteren Menschen, insbesondere (hormonell bedingt) bei älteren Frauen, stark verbreitet. Aus diesem Grund werden älteren weiblichen Patienten häufig Sexualhormone verabreicht, die den Prozeß des Knochenabbaus zwar stoppen können, jedoch zum Teil schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen haben. Spezifische Osteoporose-Medikamente sind bislang nicht entwickelt worden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nunmehr überraschenderweise festgestellt, daß Mutationen der Nukleinsäuresequenz, die für das ClC-7 Protein (Chloridkanal ClC-7) kodiert und die Expression eines nicht-funktionellen Proteins bewirkt bzw. die Expression vollständig unterbindet, in Mäusen zu einer sehr schweren Form der Osteopetrosie führt. Auf Basis dieser überraschenden Ergebnisse wurde festgestellt, daß auch Patienten mit schwerer juveniler Osteopetrosie Mutationen im ClC-7 Gen aufweisen.

Bei dem Chloridkanal ClC-7 handelt es sich um einen vorwiegend intrazellulären, in späten Endosomen und Lysosomen vorkommenden Chloridkanal, der ubiquitär exprimiert ist und insbesondere auch in Osteoklasten, den knochenabbauenden Zellen, vorkommt. Mutationen, die die Expression eines nicht-funktionellen ClC-7 Proteins bewirken, oder eine Expression vollständig unterbinden (im folgenden "Knock-Out" oder "KO" genannt) verhindern, daß Osteoklasten den Knochen abbauen können. Genaue Untersuchungen haben ergeben, daß ClC-7, der zusammen mit der Protonenpumpe in die sogenannte "Ruffled Border" eingebaut wird, die die Resorptionslakune begrenzt und über die Säureäquivalente in die Resorptionslakune transportiert werden, durch eine Chloridleitfähigkeit den elektroneuralen Transport von HCl in die Lakune gewährleistet. Ein saurer pH-Wert in der Lakune ist essentiell für den Knochen-

abbau. Fehlt eine entsprechende Chloridleitfähigkeit, kann die Protonenpumpe nicht effektiv pumpen, mit der Folge, daß Osteoklasten die Resorptionslakune nicht ansäuernd den Knochen abbauen können.

Durch den Knock-Out von ClC-7 kommt es ferner zu einer starken Retinadegeneration, und es wird ferner eine Neurodegeneration im zentralen Nervensystem (ZNS) beobachtet. Diese Beobachtungen können darauf zurückgeführt werden, daß die spät-endosomale und lysosomale Ansäuerung und Degradation durch den ClC-7 Knock-Out in vielen Geweben gestört ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde ebenfalls festgestellt, daß Chloridkanäle der CLC Genfamilie auch an der Ansäuerung synaptischer Vesikel beteiligt sind. Dies wurde beispielsweise durch den Knock-out des ClC-3 Kanals gezeigt. Bei diesem Knock-out kommt es zu Veränderungen der synaptischen Transmission im Zentralnervesystem und zu einer neuronalen Degeneration. Es wurde ferner festgestellt, daß auch andere CLC Kanäle, wie ClC-4 und ClC-7, in synaptischen Vesikeln vorkommen. Synaptische Vesikel nehmen Neurotransmitter auf, die sie über Exozytose in den synaptischen Spalt abgeben und damit die nachgeschaltete Nervenzelle modulieren (erregen oder inhibieren). Die Aufnahme von Neurotransmittern in synaptische Vesikel wird von dem pH-Gradienten und Potentialgradienten über die Membran der synaptischen Vesikel getrieben (vgl. Literaturzitate (62)-(67)), so daß die Aktivität von Chloridkanälen in synaptischen Vesikeln die Signaltransduktion im Nervensystem beeinflußt.

Durch die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung angestellt wurden, ist es nunmehr möglich, ein Testsystem zur Verfügung zu stellen, das die Identifizierung und das Testen von Substanzen ermöglicht, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 - insbesondere die vorwiegend intrazellulären Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 - zu inhibieren oder anderweitig in der

Aktivität zu beeinflussen, d.h. beispielsweise zu aktivieren oder ihre Regulation zu verändern. Insbesondere wird erstmals ein Testsystem und ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen bereitgestellt, die den Chloridkanal ClC-7 (ganz oder teilweise) inhibieren, insbesondere von Substanzen, die zur Behandlung von Osteoporose oder von Morbus Paget geeignet sind. Ein derartiges Testsystem erlaubt auch die Identifikation von Substanzen, die die neuronale Signaltransduktion beeinflussen und daher zur Behandlung neuronaler Erkrankungen geeignet sind.

Der Erfindung liegt die Überlegung zugrunde, daß eine (partielle) Inhibition des ClC-7 Chloridkanals die Osteoklastenfunktion hemmt und damit dem Knochenabbau entgegenwirkt. An ähnlichen Ansätzen wird in der pharmazeutischen Industrie geforscht, wo nach effektiven Inhibitoren der Protonenpumpe gesucht wird. Durch die vorliegenden Erkenntnisse ist es nunmehr erstmals möglich, Substanzen zu identifizieren, die spezifisch auf den ClC-7 Chloridkanal wirken und eine partielle oder vollständige Inhibition bewirken oder den Kanal aktivieren bzw. dessen Regulation verändern. Das Problem, daß ein totaler KO auch andere Gewebe beeinflußt und z.B. eine Retinadegeneration und eine Degeneration des ZNS verursacht und daher auch eine pharmakologische Inhibition von ClC-7 (d.h. durch Verabreichung von ClC-7-Inhibitoren) ähnliche Effekte haben könnte, kann einerseits dadurch gelöst werden, daß man eine nur partielle Inhibition des Kanals bewirkt, und andererseits dadurch, daß man Wirkstoffe oder Pharmaka verwendet, die diese Organe (z.B. aufgrund der Blut-Hirn-Schranke) nicht in genügend hoher Konzentration erreichen.

Der Erfindung liegt weiterhin die Überlegung zugrunde, daß durch eine Inhibition oder Stimulation von Chloridkanälen synaptischer Vesikel die synaptische Übertragung im Nervensystem beeinflußt werden kann. Eingriffe in die synaptische Transmission sind ein vielbenutztes Prinzip der Pharmakologie zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen. So werden z.B. Substanzen eingesetzt, die die entsprechenden Aufnahmetransporter in synaptischen Vesikeln beeinflussen, oder die die Wiederauf-

nahme des ausgeschütteten Neurotransmitters aus dem Extrazellulärraum in die Zelle beeinflussen. Die Aufnahme der Neurotransmitter in synaptische Vesikel erfolgt über in deren Membran lokalisierte Transporter, die i.A. an den elektrochemischen Gradienten für Protonen über die Vesikelmembran gekoppelt und getrieben wird (vgl. Publikationen (81) und (82)). Verändert man diesen Gradienten, so kann man die Aufnahme von Transmittern teilweise differentiell verändern. Einerseits sind möglicherweise bestimmte CLC Kanäle nur in bestimmten Subpopulationen von Nervenzellen oder synaptischen Vesikeln (z.B. für bestimmte Neurotransmitter) vorhanden, andererseits besteht der elektrochemische Gradient für Protonen aus zwei Komponenten (ΔpH und $\Delta\psi$), an den die verschiedenen Transporter verschieden gekoppelt sind. So wird die Aufnahme von Azetylcholin hauptsächlich über den pH-Gradienten getrieben, während die Aufnahme von Glutamat hauptsächlich von der elektrischen Spannung $\Delta\psi$ getrieben wird.

Der elektrochemische Gradient für Protonen in synaptischen Vesikeln wird von der Protonenpumpe im Zusammenspiel mit Chloridkanälen aufgebaut. Die Anwesenheit einer Chloridleitfähigkeit verringert den elektrischen Anteil $\Delta\psi$ des Gradienten und erhöht den ΔpH -Anteil. Eine Inhibition eines Chloridkanals in synaptischen Vesikeln verringert also ΔpH , erhöht jedoch $\Delta\psi$; dadurch wird z.B. die Aufnahme von Azetylcholin verringert, die Aufnahme von Glutamat jedoch erhöht, vorausgesetzt, der Kanal kommt auf beiden Vesikeltypen vor. Gemäß einer besonderen Ausführungsform kann umgekehrt auch eine spezifische Stimulation von einzelnen Chloridkanälen erfolgen. Dies hat z.B. eine Verringerung der Glutamataufnahme und eine Erhöhung der Azetylcholinaufnahme zur Folge.

Neben der Möglichkeit, die Konzentration von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln zu modulieren, können derartige Substanzen auch den Transport der Vesikel innerhalb der Zelle, z.B. auch die Endo- und Exozytose, beeinflussen. Dies folgt aus der Beobachtung, daß beim Knock-out des CLC-5 das endozytotische Trafficking beeinflusst wird (stark verringert ist; vgl. (8)),

sowie daraus, daß der endozytotische und exozytotische Weg durch Verminderung des vesikulären pH-Wertes erheblich gestört werden kann (vgl. Publikationen (69) bis (74)).

Substanzen, die die Aktivität der vorwiegend intrazellulär vorkommenden CLC Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 beeinflussen und insbesondere inhibieren, sind somit als Therapeutika für neurologische und neuromuskuläre Erkrankungen sowie anderen Nervenkrankheiten und, im Falle von ClC-7, für Osteoporose, Morbus Paget, und andere knochenabbauende Krankheiten geeignet. Im Rahmen der Erfindung werden daher diese Kanalproteine als Zielmoleküle benutzt, um Substanzen für die Behandlung dieser Krankheiten zu finden und weiterzuentwickeln.

Als Methoden zum Auffinden und Testen dieser Substanzen kommen mehrere Methoden in Betracht. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird die Bindung der Substanzen an das Zielmolekül durch dem Fachmann gut bekannte Methoden getestet. Dazu werden die Kanalproteine z.B. von Bakterien, Hefen, oder Säugetierzellen heterolog exprimiert und gereinigt. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt. Die Bindung der Substanzen an die Proteine kann in einer bevorzugten Ausführung der Erfindung über gut bekannte Methoden der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Fluoreszenz-Intensitätsverteilungsanalyse (vgl. Referenzen (85) bis (88)) erfolgen. In einer anderen bevorzugten Ausführung erfolgt die Messung über ebenfalls gut bekannte Methoden der Plasmonenresonanzmessung (vgl. Referenzen (89) bis (94)).

Eine weitere bevorzugte Methode dieser Erfindung zur Identifizierung von Substanzen, die auf die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 wirken, sind Testsysteme, in denen das entsprechende Kanalprotein funktionell exprimiert wird, die anderen Kanalprotein jedoch entweder weniger oder gar nicht vorhanden sind. Derartige Systeme sind auch zum Testen der bei den obigen Bindungsverfahren gefundenen Substanzen auf funktionelle Effekte sinnvoll. In diesem Fall erfolgt die Messung über die Funktion des Kanalproteins, das in bestimmten Systemen entweder Ströme,

Spannungen, oder pH-Werte ändert, die dann entweder direkt gemessen werden oder deren Effekt auf Detektionssysteme gemessen wird.

In einer bevorzugten Ausführung der Erfindung wird die Wirksamkeit der Substanz auf einen Kanal ClC-x ($x=3, 4, 6$ oder 7) an Zellen oder davon abgleiteten Präparaten (wie Membranpräparationen oder Vesikel) gemessen, die ausschließlich oder vorzugsweise (überwiegend) nur den Kanal ClC-x exprimieren (z.B. bei der Suche nach Osteoporose-Medikamenten ClC-7).

Die Spezifität wird dadurch getestet, daß man die Wirksamkeit von Testsubstanzen beispielsweise an Zellen mißt, die ausschließlich oder vorzugsweise (überwiegend) nur den ClC-7 Kanal exprimieren. Diese Zellen bzw. Zelllinien erhält man beispielsweise durch Isolierung aus nicht-menschlichen Säugern, vorzugsweise Nagern (insbesondere Mäusen), deren Keimzellen und somatischen Zellen für Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen enthalten, bei denen möglichst viele der für die Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen - mit Ausnahme des Chloridkanals für den ein spezifischer Inhibitor gesucht wird - durch Mutation, Trunkation, vollständige Deletion und/oder teilweise Deletion so verändert ist, daß die jeweiligen Chloridkanäle nicht oder nicht funktionell exprimiert werden. Nicht funktionell bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das Protein des Chloridkanals so exprimiert wird, daß die Transportfunktion des Chloridkanals vermindert oder ganz unterbunden ist. Diese genetischen oder gentechnischen Veränderungen werden auch als Knock-out bezeichnet. Entsprechende genetisch veränderte Mäuse (als Beispiel für nichtmenschliche Säuger) werden auch als Knock-out Mäuse oder KO Mäuse bezeichnet. Als Knock-out des ClC-1 Kanals existieren beispielsweise natürliche Mutanten bei der Maus und dem Menschen, d.h., eine nicht-funktionelle oder fehlende Expression des ClC-1 Kanals kommt natürlicherweise bei einem gewissen Prozentsatz der Population vor, was zur Myotonia Congenita führt. Bei einem Knock-out des ClC-K1-Kanals oder des ClC-KB-Kanals kommt es zu

diabetes insipidus (bei der Maus) bzw. zum Bartter-Syndrom (beim Menschen). Ein Knock-out von ClC-5 führt zur Dent-Erkrankung.

Selbstverständlich kann die Spezifität auch durch andere Methoden gemessen werden, beispielsweise am isolierten Kanalprotein, das z.B. durch Überexpression erhältlich ist. Entsprechende Verfahren zur Klonierung und Expression der für das entsprechende Kanalprotein kodierenden Nukleinsäuresequenz sind dem Fachmann genauestens bekannt. Ferner kann die Spezifität auch direkt durch Verwendung geeigneter Assays, wie z.B. des "pit assay" (siehe unten) bestimmt werden, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

Der experimentell erzeugte Knock-out von Ionenkanälen und insbesondere von Chloridkanälen ist dem Fachmann gut bekannt und beispielsweise in den im Anhang zitierten Publikationen (1) bis (8) beschrieben. Ferner ist bekannt, daß zahlreiche Veränderungen der für Chloridkanäle kodierenden Nukleinsäuresequenzen zur fehlenden oder nicht-funktionellen Expression der Proteine führen (vgl. Publikationen (9) bis (24)). Der allgemeine strukturelle Aufbau bzw. die Transmembran-Topologie der Chloridkanäle ist schematisch in Fig. 1 dargestellt. Beispielsweise führen bereits einzelne Punktmutationen in den Domänen der D3 bis D5 zu Störungen oder einem Ausfall der Expression bzw. zur Expression eines Proteins, das keine Chloridkanal-Eigenschaften aufweist. Der gleiche Effekt kann durch Trunkation im Bereich der Domänen D10 bis D12 erreicht werden bzw. allgemein durch Trunkation in Transmembran-spannenden Domänen. Selbstverständlich kann auch das Gen, d.h. die für den Chloridkanal kodierende Nukleinsäuresequenz vollständig deletiert werden oder durch eine für ein anderes Protein kodierende Nukleinsäuresequenz ersetzt werden, oder der die Genexpression steuernde Promotorbereich mutiert werden. Ziel der genetischen Veränderung ist es, die Protein-Expression zu unterbinden oder die nicht-funktionelle Expression des Proteins zu bewirken. Alternativ kommt auch ein sogenannter Knock-down in Betracht, bei dem die gentechnischen Veränderungen lediglich zu einer Einschränkung der Chloridkanal-Funktion führen, ohne die Transporteigenschaften ganz zu unterbinden. Derartige Knock-down

Strategien sind dem Fachmann wohlbekannt und schließen z.B. antisense Strategien oder Ribozymstrategien, d.h. Knock-down unter Verwendung von antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen, ein, sind jedoch nicht auf diese beschränkt. Bei dem Knock-down zur Anwendung kommende Methoden sind in den im Anhang zitierten Publikationen (25) bis (36), auf die vorliegend ausdrücklich Bezug genommen wird, eingehender beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können sowohl somatische Zelllinien verwendet werden, die aus einem genetisch veränderten nicht-menschlichen Säuger (Nager, insbesondere Maus) hergestellt sind, als auch solche Zelllinien, bei denen die Expression der entsprechenden Kanäle ClCxxx nachträglich durch genomische Mutationen der somatischen Zelllinie heruntergesetzt oder abgeschafft wurde und/oder die Expression der Kanäle durch andere Verfahren wie z.B. über Anti-Sense Technologie oder Ribozymstrategien herunterreguliert werden. Diese Herabregulation oder Verminderung der Expression kann insbesondere auch induzierbar sein und damit Vitalitätsprobleme und andere Probleme, die beim Ausschalten mehrerer Chloridkanäle gleichzeitig entstehen können, verhindern oder abmildern. Diese Zelllinien können auch menschlichen Ursprungs sein.

Bei der Identifikation und beim Testen von Substanzen hinsichtlich ihrer Chloridkanal-spezifischen Wirkung geht man vorzugsweise von genetisch veränderten nicht-menschlichen Säugern oder von Zelllinien aus, bei denen vorzugsweise zwei oder drei Chloridkanäle nicht bzw. nicht-funktionell exprimiert werden. Im Falle des Chloridkanals ClC-7 darf die Expression dieses Chloridkanals nicht gestört sein, so daß ein Knock-Out oder Knock-down eines oder mehrerer anderer Chloridkanäle, beispielsweise aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-6, erfolgen muß. Entsprechendes gilt auch, wenn Substanzen identifiziert und getestet werden sollen, die auf einen anderen Kanal spezifisch wirken. So müßten für einen Test gegenüber ClC-4 z.B. Zelllinien etabliert werden, die nur den ClC-4-Kanal exprimieren. Das Testen der Substanzen kann entweder direkt an diesen Zellen erfolgen,

oder auch an von diesen Zellen gewonnenen Präparaten, wie z.B. Vesikeln, Membranpräparationen, insbesondere synaptischen Vesikelpräparationen, oder gereinigten Proteinen. Verfahren zur Isolierung dieser Präparate sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Spezifität der Wirkung gegen einen bestimmten ClC Chloridkanal wird dadurch getestet, daß man einerseits wie beschrieben zum Auffinden der Substanzen Zelllinien benutzt, die in den getesteten intrazellulären Kompartimenten hauptsächlich oder ausschliesslich nur diesen bestimmten Chloridkanal enthalten, oder man die oben genannten, davon abgeleiteten Präparate verwendet. Substanzen, die den erwarteten Effekt in diesen Zelllinien oder an davon abgeleiteten Präparaten aufweisen, werden sodann auf andere Zelllinien oder davon abgeleitete Präparate getestet, die diesen Kanal nicht besitzen. Wenn sie spezifisch sind, sollten sie auf diese Zelllinien keinen Effekt haben. Je nach Kanal schliessen sich spezifischere Assays an: Will man z.B. den Effekt auf den ClC-7 Kanal mit Hinsicht auf die Osteoporose testen, kann man kultivierte Wildtyp (WT) Osteoklasten in einem "pit-assay" (vgl. Publikationen (52) bis (58)) auf Dentin, Elfenbein, Knochen oder andere geeignete Substrate testen und beispielsweise die Bildung von Löchern im Substrat untersuchen oder die Azifidierung der Resorptionslakune mit Farbstoffen (z.B. Acridin Orange) untersuchen (vgl. Publikationen (59) bis (61)).

Zieht man auf die Inhibition von Chloridkanälen synaptischer Vesikel ab (wie z.B. ClC-3), so kann im nächsten Schritt die Azifidierung gereinigter synaptischer Vesikel in Suspension mit Farbstoffen gemessen werden (vgl. Publikationen (62) bis (64)). Eine Inhibition des Kanals sollte sich in einer Inhibition der Azifidierungsrate äussern, die Spezifität ist dadurch überprüfbar, daß man synaptische Vesikel aus der entsprechenden KO Maus isoliert, auf deren Azifidierungsrate die Substanz keinen Effekt haben sollte. In weitergehenden Schritten lässt sich die Spezifität auf bestimmte Typen von synaptischen Vesikel testen, indem man die Aufnahme von (z.B. radioaktiv markierten) Neurotransmittern in synaptische Vesikel in An- und Abwesenheit der

Substanz bestimmt. Die entsprechenden Methoden sind dem Fachmann wohlbekannt (vgl. z.B. Publikationen (65) bis (68)).

Somatische Zelllinien lassen sich aus verschiedenen Geweben der KO Mäuse gewinnen, wobei das Material möglichst steril gewonnen wird und entweder nativ oder preferentiell nach enzymatischem Verdau in entsprechende Zellkulturbehältnisse (z.B. Schalen) zusammen mit Nährmedien (z.B. Dulbecco's MEM, vorzugsweise zumindest anfänglich mit Antibiotikazusatz) gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wird. Die Zellen werden mit Standardtechniken der Zellkultur vermehrt, wobei gemäß einer besonderen Ausführungsform der Erfindung eine Immortalisierung der Zelllinie durch Transfektion mit entsprechenden Genen (z.B. SV40 largeT Antigen, oder Telomerase) erfolgt (vgl. Publikationen (37) bis (39)). Als Alternative kann man KO Mäuse mit einem Mausstamm kreuzen, der ein entsprechendes Immortalisierungsgen exprimiert (wie z.B. die Immorto-Maus, vgl. Publikationen (40) bis (42), aber auch andere Mäuse (vgl. Publikation (43)), die diese Gene eventuell unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimieren).

Im Besonderen kann man diese Zelllinien als Testsystem weiterentwickeln, indem man sie mit entsprechenden Konstrukten transfiziert, die Proteine exprimieren die direkt oder indirekt als Indikator für die Messmethode dienen. Beispielsweise können chimäre Proteine exprimiert werden, die aufgrund bestimmter Proteinsequenzsignale spezifisch in bestimmte Kompartimente gelenkt werden. Der andere Teil der Chimäre enthält entweder direkt ein entsprechendes Indikatorprotein (wie z.B. pH-sensitive fluoreszente Proteine wie bestimmte GFP Mutanten (vgl. Publikationen (44) bis (46)), oder Bindungsstellen, um Indikatorsubstanzen (wie z.B. Antikörper (vgl. Publikation (49)), Biotin-gekoppelte Farbstoffe (vgl. Publikation (47)) in diese Kompartimente zu lenken (vgl. (44) bis (51)).

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft somit die Verwendung der oben genannten nicht-menschlichen Säuger oder

somatischer Zelllinien (menschlichen oder nicht-menschlichen Ursprungs) zur Identifizierung von Substanzen, die auf die synaptische Transmission wirken. Erstmals wird ein Testsystem und ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen bereitgestellt, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 inhibieren oder anderweitig in der Aktivität beeinflussen (d.h. beispielsweise aktivieren oder seine/ihre Regulation verändern) insbesondere von Substanzen, die zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka geeignet sind.

Eine Abgrenzung von Osteoporose Wirkstoffen ist einmal dadurch gegeben, daß Osteoporose-Wirkstoffe eine Beeinflussung des ClC-7 betreffen müssen. Das heißt, daß zum Beispiel Wirkstoffe gegen ClC-3 (der auf synaptischen Vesikeln vorkommt) nicht mit der extrazellulären Azifidierung der Osteoklasten interferieren werden. Andererseits kann man gegebenenfalls Substanzen, die auf ClC-7 wirken, so modifizieren, daß sie die Blut-Hirn-Schranke nicht durchqueren und daher nicht im ZNS wirken können. Derartige Methoden sind dem Fachmann wohlbekannt. Es ist auch denkbar, daß Substanzen spezifisch in bestimmte Neuronengruppen gelenkt (gerichtet bzw. sortiert) werden (z.B. durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren), oder die Stoffe über in diesen Neuronen vorhandene spezifische enzymatische Aktivitäten erst zu der aktiven Substanz metabolisiert werden.

Ein Test der Spezifität kann, wie oben angegeben, einerseits anhand entsprechender Zelllinien durchgeführt werden, die nur bestimmte Kanaltypen exprimieren, an davon abgeleiteten Präparaten (siehe oben) oder in spezifischen Testsystemen, wie Osteoklasten in Kultur, oder an synaptischen Vesikelpräparationen aus WT und KO Tieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 kodiert,

wobei die Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.

Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderten nicht-menschlichen Säuger, dessen Keimzellen und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei die für ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist (sind).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält der genetisch veränderte, nicht-menschliche Säuger zusätzlich die für ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb und/oder ClC-5 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en), die durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist (sind).

Aus dem Säuger, der insbesondere ein Nager und besonders bevorzugt eine Maus ist, werden erfindungsgemäß somatische Zelllinien etabliert bzw. abgeleitet, die einen oder mehrere der Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 nicht exprimieren. Wie bereits beschrieben, ist es auch möglich, aus diesen nicht-menschlichen Säugern Präparate abzuleiten, wie z.B. Vesikel- und andere Membranpräparationen, im besonderen auch synaptische Vesikelpräparationen, die ein entsprechendes Expressionsmuster bezüglich der Chloridkanäle aufweisen und die daher ebenso geeignet sind wie die KO Tiere oder Zelllinien als solche.

Gegenstand der Erfindung sind ferner somatische Zelllinien, bei denen die Expression der Chloridkanäle ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, insbesondere aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7, entweder durch genomische Mutationen der somatischen Zelllinie heruntergesetzt und/oder die Expression der Kanäle durch andere Verfahren

wie z.B. über Anti-Sense Technologie oder Ribozymstrategien herunterreguliert werden. Diese Herabregulation kann insbesondere auch induzierbar sein, um Probleme mit der Vitalität der Zellen und andere Probleme, die beim Ausschalten mehrerer Chloridkanäle gleichzeitig entstehen können, zu verhindern oder abzumildern.

Die o.g. Zelllinien können auch menschlichen Ursprungs sein.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist/sind, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere der Chloridkanäle zu inhibieren.

Vorzugsweise werden Säuger verwendet, bei denen eine oder mehrere der für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierenden Nukleinsäuresequenzen (gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, wobei jeweils eine der für ClC-7, ClC-3, ClC-4 oder ClC-6 kodierenden Sequenzen nicht verändert ist, so daß dieser Chloridkanal normal, d.h. funktionell exprimiert wird.

Anstelle der Säuger können auch die oben genannten Zelllinien (menschliche und nicht-menschliche) oder davon abgeleitete Präparate (siehe oben) verwendet werden.

Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4,

ClC-6 und ClC-7 zu inhibieren oder anderweitig in seiner/ihrer Aktivität zu beeinflussen, d.h. beispielsweise zu aktivieren oder ihre Regulation zu verändern. Bei diesem Verfahren bestimmt man an Zelllinien bzw. Zellen (oder an davon abgeleiteten Präparaten, insbesondere Membranpräparationen, wie Vesikeln; siehe oben), die nur einen Chloridkanal aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 exprimieren, den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran. Anschließend bringt man diese Zelllinien bzw. Zellen mit den zu testenden Substanzen in Kontakt, und bestimmt erneut den luminalen pH-Wert des den Kanal exprimierenden Kompartiments und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran. Eine Veränderung eines oder beider physikalischer Parameter bedeutet, daß die Testsubstanz den betreffenden Chloridkanal beeinflußt. Eine Erhöhung des pH-Wertes bedeutet, daß es sich um eine den Chloridkanal (partiell) hemmende bzw. (partiell) inhibierende Substanz handelt. Die Erniedrigung des pH-Wertes deutet auf eine Ansäuerung des Kompartiments und damit auf eine den Chloridkanal aktivierende Substanz hin. Ebenso bedeutet die Messung einer Spannungs-Erhöhung, daß es sich um eine den Chloridkanal (partiell) hemmende bzw. (partiell) inhibierende Substanz handelt. Die Erniedrigung des Spannung deutet auf eine den Chloridkanal aktivierende Substanz hin. Dabei ist die Aktivität einer Substanz im Hinblick auf ihre Fähigkeit, den betreffenden Chloridkanal zu beeinflussen, umso höher, je niedriger die hinzuzusetzende Konzentration der Substanz ist, um eine Änderung des oder der physikalischen Parameter zu bewirken.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf dem Prinzip, daß eine Änderung der Aktivität intrazellulärer Chloridkanäle den luminalen pH-Wert der sie exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die sie umschließende Membran ändern kann. Chloridkanäle gestatten eine Ladungsausgleich für die in den gleichen Vesikeln (z.B. des endo- oder exozytotischen Weges) vorkommende Protonenpumpe, die eine höhere Pumpleistung und damit eine stärkere Ansäuerung des Kompartiments bewirken. Gleichzeitig

verringern sie die elektrische Spannung über diese Membran. Eine Inhibition oder Ausschaltung der Chloridkanäle würde also eine verringerte Ansäuerung und eine größere elektrische Spannung, eine Stimulation Ihrer Aktivität jedoch eine verstärkte Ansäuerung und eine Verringerung der elektrischen Spannung zur Folge haben. Bei der vorliegenden Erfindung wird der Effekt der zu testenden Substanzen auf die entsprechenden Chloridkanäle indirekt über einen oder mehrere Effekte der veränderten Ansäuerung und/oder Spannung von intrazellulären Kompartimenten gemessen. Um spezifische Substanzen für einen bestimmten Kanaltyp zu identifizieren, sollen die gemessenen Kompartimente in der bevorzugten Anwendung möglichst nur einen Chloridkanal, gegen den getestet wird, enthalten. Die Chloridkanal-Spezifität wird dadurch belegt, daß man Kontroll-Untersuchungen an Zelllinien durchführt, die einen anderen Kanal exprimieren. Sofern die Kompartimente mehr als einen Chloridkanal exprimieren, müssen weitere Messungen an anderen KO-Zelllinien oder -Mäusen durchgeführt werden, wie oben beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 zu inhibieren, ist dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) an Zellen, die nur einen oder hauptsächlich bzw. überwiegend nur einen der genannten Chloridkanäle exprimieren, den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,
- b) die Zellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
- c) an den Zellen erneut den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,

wobei der Unterschied zwischen dem pH-Wert und/oder der Membran- spannung vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

Wie bereits erwähnt, besteht eine Verfahrensvariante in der direkten Messung des pH-Wertes intrazellulärer Organellen oder in der Messung der infolge der Änderung des pH-Werts eintretenden zellulären Effekte. Zur Messung des pH-Wertes kommen mehrere Methoden in Frage. Es gibt beispielsweise Farbstoffe, deren Fluoreszenz pH-abhängig ist und/oder die sich in Kompartimenten mit bestimmten pH-Werten selektiv anreichern, wenn man die Zellen mit ihnen oder ihren Vorläuferstufen inkubiert (Beispiele: Acridin Orange, Lysotracker und andere Farbstoffe der Fa. Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Höhere Spezifität für bestimmte Kompartimente lässt sich z.B. durch endozytotische Aufnahme von Farbstoffen erreichen (Anfärben endozytotischer Kompartimente, je nach Aufnahmezeit frühe oder späte bis lysosomale Kompartimente; vgl. z.B. Publikationen (71), (75), (76)). Noch höhere Spezifität für bestimmte Kompartimente lässt sich dadurch erreichen, daß die Farbstoffe über angekoppelte Molekülgruppen (wie zB spezifische Antikörper oder Biotin) an bestimmte Zielmoleküle gebunden werden, die in bestimmten Kompartimenten vermehrt oder ausschliesslich vorkommen, d.h., die in der Zelllinie exprimiert werden (z.B. durch permanente Transfektion), wobei man die Zelllinie mit dem Farbstoff in Kontakt bringt. Diese Zielmoleküle können auch über molekulär-zellbiologische Techniken hergestellt werden, indem z.B. ein Zielsteuerungssignal, das das Molekül über die entsprechende Maschinerie der Zelle in ein bestimmtes Kompartiment dirigiert, an ein entsprechendes Bindungsmotif (z.B. Epitop für Antikörper oder Avidin) molekulärbiologisch fusioniert wird und das Konstrukt dann in der entsprechenden Zelllinie, die zum Testen der Substanzen dient, exprimiert wird. Durch derartige Techniken lassen sich vorwiegend bis sehr spezifisch nur bestimmte Kompartimente (in denen der entsprechende Kanal vorkommt) messen. Als weitere Technik zur pH-Messung dienen auch z.B. die Akkumulation bestimmter Substanzen in Kompartimenten mit einem bestimmten

pH-Wert (wie z.B. Acridin Orange oder Lysotractor von Molecular Probes) oder indirekte Tests, bei denen pH-abhängige Reaktionen in den Kompartimenten ausgenutzt werden, um Indikatorsubstanzen herzustellen (z.B. durch pH-abhängige proteolytische Spaltung), die dann leicht nachweisbar sind (z.B. durch Verwendung von Farbstoffen (vgl. Publikationen (95) und (96)), wobei der Nachweis aber nicht darauf beschränkt ist).

Alternativ oder zusätzlich kann die Membranspannung in diesen Kompartimenten gemessen werden, z.B. über Spannungs-sensitive Farbstoffe (vgl. z.B. Publikation (67)). Alternativ kommen auch hier protein-kodierte Spannungssensoren (vgl. z.B. Publikation (77)), die möglicherweise noch spezifisch gelenkt bzw. sortiert werden, in Frage.

Mit der vorliegenden Erfindung wird erstmals ein Testsystem zur Verfügung gestellt, mit dem sich Wirkstoffe identifizieren und testen lassen, die zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget oder zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder zur Herstellung von Psychopharmaka geeignet sind. Erfindungsgegenstand ist somit auch die Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget, sowie die Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder von Psychopharmaka. Ferner betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen (Arzneimittel) zur Behandlung von Osteoporose oder Morbus Paget, die ein oder mehrere Substanzen enthalten, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, sowie Arzneimittel zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten und Psychopharmaka, die ein oder mehrere Substanzen enthalten, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4,

ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren. Die Arzneimittel enthalten die Wirkstoffe in zur oralen oder intravenösen Verabreichung geeigneter Formulierung, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Trägerstoffen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: Transmembran Topologie-Modell von ClC-Kanälen nach der biochemischen Studie von Schmidt-Rose und Jentsch (T. Schmidt-Rose und T.J. Jentsch , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 7633-7638). N- und C-Terminal sind intrazellulär lokalisiert. Initiale Hydropathie-Analyse von ClC-0 zeigte das Vorliegen von bis zu 13 Transmembrandomänen (D1-D13). Außer einigen prokaryontischen ClCs besitzen alle bekannten ClC-Proteine zwei CBS-Domänen (vgl. A. Bateman, Trends Biochem. Sci. 22 (1997) 12-13 und C.P. Pointing, Mol. Med. 75 (1997) 160-163) am C-Terminus.

Beispiele

Beispiel 1

Protokoll zur Erzeugung von Knock-outs am Beispiel des ClC-7:

Die ClC-7 knock-out Maus wurde über Standard-Methoden hergestellt, die dem Fachmann gut bekannt sind und u.a. in Methodenbüchern (vgl. z.B. Publikation (78)) detailliert beschrieben sind. Diese Technik erfordert mehrere Schritte. Im ersten Schritt wird ein DNA Konstrukt hergestellt, das neben der Zielsequenz (in diesem Fall genomische Sequenz der Maus, die das für den ClC-7 Kanal kodierende Gen enthält) entsprechende Selektionsmarker enthält. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe dieses DNA Konstrukts ein Allel des Zielgens in pluripotenten embryonalen Stammzellen der Maus über homologe Rekombination so verändert, daß es nicht mehr für ein funktionelles Protein kodieren kann. Im dritten Schritt werden diese rekombinanten embryonalen Stammzellen in Maus-Blastozysten injiziert, die danach pseudo-schwangeren Ammenmüttern (Mäuse) in den Uterus transplantiert werden. Diese tragen dann Nachkommen aus, die chimär sind, d.h. neben den genetisch modifizierten Zellen, die aus den injizierten Stammzellen hervorgehen, auch normale, genetisch nicht manipulierte Zellen der Blastozyste, in die injiziert wurde, enthalten. Diese chimären Mäuse werden mit normalen "Wildtyp" (WT) Mäusen verpaart. Bei den Nachkommen wird getestet (z.B. über Southern blotting oder über PCR Techniken), ob das genetisch modifizierte, also funktionell zerstörte, Gen über die Keimbahn vererbt wurde. Im positiven Fall handelt es sich jetzt um heterozygote Tiere, bei denen das Kanalgen auf einem der beiden Chromosomen zerstört ist. Heterozygote Mäuse werden untereinander gekreuzt, um letztendlich homozygote knock-out Tiere zu erhalten, bei denen die entsprechenden Kanalgene auf beiden Chromosomen zerstört sind.

Im Fall der ClC-7 KO Maus wurde das Konstrukt wie folgt hergestellt: Mit Hilfe einer Ratten cDNA-Sonde (Proteinsequenz publi-

ziert in Referenz (79)); Accession No. für Protein und cDNA: Z67744 GenBank) wurde eine kommerziell erhältliche genomische Phagenbank in dem Vektor λFIXII des Mausstammes 129/Sv (Firma Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA) über Standardmethoden der Ausplattierung, Abziehen von Filtern, und Hybridisierung mit der radioaktiv markierten cDNA Sonde durchmustert. Mehrere Phagenklone, die unter hoher Stringenz hybridisierten, wurden isoliert, gereinigt, und mit Standardmethoden der Restriktionskartierung, Ansequenzierung, und Probeamplifikation ausgewählter Fragmente über PCR, analysiert. Ein genomischer Klon, der ein ungefähr 14 kb grosses Stück der genomischen Sequenz von ClC-7 inklusive des Exons 2 (vgl. (80)) enthielt, wurde zur Herstellung des Konstrukts ausgewählt. Hierbei wurde der genomische Klon mit den beiden Restriktions-enzymen BgIII und BsrGI verdaut, wodurch der Teil der Sequenz, der die kodierenden Exone 3, 4, 5, 6 und 7 enthält, entfernt wurde. Dieser Teil wurde durch ein ungefähr 1.6 kb grosses DNA Fragment, das eine von dem Phosphoglycerat-Promotor getriebene Neomycinresistenz Kassette enthält, ersetzt, indem letzteres durch entsprechende enzymatische Reaktionen nach Standardverfahren in die genomische Sequenz ligiert wurde. Nach Transformation von Bakterien mit dem entsprechenden, dieses Konstrukt enthaltenen Vektors wurden die das korrekte Konstrukt enthaltenen Bakterienkolonien isoliert, die DNA extrahiert, und nach Verdau mit HindIII am 5'-Ende des Konstruktcs eine Thymidin-Kinase Kassette zur negativen Selektion angefügt. Nach abermaliger Transformation, Isolation und Überprüfung des nunmehr fertigen Konstruktcs wurden damit pluripotente embryonale Stammzellen (Maus) durch Elektroporation transfiziert und unter entsprechenden Kulturbedingungen (Kultivation auf "feeder layers" in Anwesenheit von leukaemia inhibitory factor (LIF), um eine Differenzierung zu verhindern) ausplattiert und vermehrt. Die Zellen wurden mit G418 (Selektion auf die Anwesenheit der Neomycinresistenzkassette) und Gancyclovir (Selektion auf Abwesenheit der Thymidinkinase Kassette) selektioniert. Resistente Klone wurden isoliert, breitgezogen, und über Southern Blot Analyse auf homologe Rekombination am ClC-7 Lokus analysiert.

Richtige Klone, bei denen das ClC-7 Gen auf einem Chromosom zerstört war (d.h. die Exone 3-7 durch die Neomycinkassette ersetzt waren), wurden hochgezogen und unter mikroskopischer Kontrolle mit Mikromanipulatoren wie oben beschrieben in Mausblastozysten injiziert. Das weitere Vorgehen war wie oben beschrieben. Da die genetische Veränderung über die Keimbahn vererbt wurde, gelang so die Herstellung einer ClC-7 KO-Maus. Die Abwesenheit des ClC-7 Kanalproteins wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen, der gegen ein aminoterminales Peptid von ClC-7 hergestellt wurde. Die ClC-7 KO Maus zeigte unerwarteterweise den Phänotyp einer starken Osteopetrosie, einhergehend mit einer Retina-Degeneration und Anzeichen degenerativer Veränderungen im Zentralnervensystem.

Beispiel 2

Erzeugung einer ClC-3 KO-Maus:

Auf ähnliche Weise wie in Beispiel 1 beschrieben wurde auch eine ClC-3 KO Maus hergestellt, bei der Exon 3, das für Sequenzen in der ersten Transmembrandomäne kodiert (vgl. Publikationen (83) und (84)), deletiert wurde. Dieses Konstrukt führt ausserdem zu einem frühzeitigen Stop der Translation, so daß ein sehr kleines, trunkiertes Protein vorhergesagt wurde. In der KO Maus konnte mit einem spezifischen Antikörper, der gegen ein aminoterminales Peptid von ClC-3 hergestellt wurde, kein ClC-3 Protein mehr nachgewiesen werden. Die ClC-3 KO Maus zeigte eine Degeneration des Hippocampus und eine Retinadegeneration. Es konnte nachgewiesen werden, dass der ClC-3 Chloridkanal in intrazellulären, vorwiegend endosomalen Kompartimenten und synaptischen Vesikeln vorkommt. pH-Messungen ergaben, daß das Fehlen von ClC-3 eine Verringerung der Azidifidierung synaptischer Vesikel verursachte.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dr. Jentsch Prof., Thomas J.

<120> Testsystem zur Entwicklung von Therapeutika,
insbesondere von Wirkstoffen zur Behandlung von
Osteoporose

<130> P056405

<140>
<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 3953
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (1)..(3953)
<223> CLCN3

<220>
<221> CDS
<222> (489)..(2951)
<223> ClC-3

<300>
<303> Genomics
<304> 1995
<305> 27 (1)
<306> 131-141
<308> GenBank / NM_001829 GI:4502868

<300>
<303> Hum. Genet.
<304> 1998
<305> 102 (2)
<306> 178-181

<400> 1
ggggtcacgg gcgaactaga acactggaa aggggctgca gttccggac cggaccggcc 60
ctgaccggaa ataatgagca aggagggtgt ggtgggttga aagccatcct actttactcc 120
cgagtttagag catggattca gttttagtct taagggggaa gtgagattgg agattttat 180
tttaatttt ggcagaagc aggttgactc tagggatctc cagagcgaga ggatttaact 240
tcatgttgct cccgtgtttg aaggaggaca ataaaagtcc caccggcaa aatttcgtta 300
acctctgcgg tagaaaacgt caggtatctt taaaatcgcg atagtttcg ctgtgtcagg 360
ctttcttcgg tggagctccg agggtagcta ggttctaggt ttgaaacaga tgcagaatcc 420
aaaggcagcg caaaaaacag ccaccgattt tgctatgtct ctgagctgcg agataatcag 480
acagctaa atg gag tct gag cag ctg ttc cat aga ggc tac tat aga aac 530
Met Glu Ser Glu Gln Leu Phe His Arg Gly Tyr Tyr Arg Asn

agc tac aac agt ata aca agt gca agt agt gat gag gaa ctt tta gat Ser Tyr Asn Ser Ile Thr Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Leu Leu Asp	578
15 20 25 30	
gga gca ggt gtt att atg gac ttt caa aca tct gaa gat gac aat tta Gly Ala Gly Val Ile Met Asp Phe Gln Thr Ser Glu Asp Asp Asn Leu	626
35 40 45	
tta gat ggt gac act gca gtt gga act cat tat aca atg aca aat gga Leu Asp Gly Asp Thr Ala Val Gly Thr His Tyr Thr Met Thr Asn Gly	674
50 55 60	
ggc agc att aac agt tct aca cat tta ctg gat ctt ttg gat gaa cca Gly Ser Ile Asn Ser Ser Thr His Leu Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro	722
65 70 75	
att cca ggt gtt ggt aca tat gat gat ttc cat act att gat tgg gtg Ile Pro Gly Val Gly Thr Tyr Asp Asp Phe His Thr Ile Asp Trp Val	770
80 85 90	
cga gaa aaa tgt aaa gac aga gaa agg cat aga cgg atc aac agc aaa Arg Glu Lys Cys Lys Asp Arg Glu Arg His Arg Arg Ile Asn Ser Lys	818
95 100 105 110	
aag aaa gaa tca gca tgg gaa atg aca aaa agt ttg tat gat gcg tgg Lys Lys Glu Ser Ala Trp Glu Met Thr Lys Ser Leu Tyr Asp Ala Trp	866
115 120 125	
tca gga tgg cta gta gta aca cta aca gga ttg gca tca ggg gca ctg Ser Gly Trp Leu Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Ala Ser Gly Ala Leu	914
130 135 140	
gcc gga tta ata gac att gct gcc gat tgg atg act gac cta aag gag Ala Gly Leu Ile Asp Ile Ala Ala Asp Trp Met Thr Asp Leu Lys Glu	962
145 150 155	
ggc att tgc ctt agt gcg ttg tgg tac aac cac gaa cag tgc tgt tgg Gly Ile Cys Leu Ser Ala Leu Trp Tyr Asn His Glu Gln Cys Cys Trp	1010
160 165 170	
gga tct aat gaa aca aca ttt gaa gag agg gat aaa tgt cca cag tgg Gly Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Glu Arg Asp Lys Cys Pro Gln Trp	1058
175 180 185 190	
aaa aca tgg gca gaa tta atc ata ggt caa gca gag ggt cct ggt tct Lys Thr Trp Ala Glu Leu Ile Ile Gly Gln Ala Glu Gly Pro Gly Ser	1106
195 200 205	
tat atc atg aac tac ata atg tac atc ttc tgg gcc ttg agt ttt gcc Tyr Ile Met Asn Tyr Ile Met Tyr Ile Phe Trp Ala Leu Ser Phe Ala	1154
210 215 220	
ttt ctt gca gtt tcc ctg gta aag gta ttt gct cca tat gcc tgt ggc Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Lys Val Phe Ala Pro Tyr Ala Cys Gly	1202
225 230 235	
tct gga att cca gag att aaa act att tta agt gga ttc atc atc aga Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser Gly Phe Ile Ile Arg	1250
240 245 250	
ggt tac ttg gga aaa tgg act tta atg att aaa acc atc aca tta gtc Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Met Ile Lys Thr Ile Thr Leu Val	1298
255 260 265 270	
ctg gct gtg gca tca ggt ttg agt tta gga aaa gaa ggt ccc ctg gta Leu Ala Val Ala Ser Gly Leu Ser Leu Gly Lys Glu Gly Pro' Leu Val	1346
275 280 285	
cat gtt gcc tgt tgc tgc gga aat atc ttt tcc tac ctc ttt cca aag	1394

His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Phe Pro Lys	290	295	300	
tat agc aca aac gaa gct aaa aaa agg gag gtg cta tca gct gcc tca	305	310	315	1442
Tyr Ser Thr Asn Glu Ala Lys Lys Arg Glu Val Leu Ser Ala Ala Ser				
gct gca ggg gtt tct gta gct ttt ggt gca cca att gga gga gtt ctt	320	325	330	1490
Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro Ile Gly Gly Val Leu				
ttt agc ctg gaa gag gtt agc tat tat ttt cct ctc aaa act tta tgg	335	340	345	1538
Phe Ser Leu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe Pro Leu Lys Thr Leu Trp				
aga tca ttt ttt gct gct tta gtg gct gca ttt gtt ttg agg tcc atc	355	360	365	1586
Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Val Leu Arg Ser Ile				
aat cca ttt ggt aac agc cgt ctg gtc ctt ttt tat gtg gag tat cat	370	375	380	1634
Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu Phe Tyr Val Glu Tyr His				
aca cca tgg tac ctt ttt gaa ctg ttt cct ttt att ctt cta ggg gta	385	390	395	1682
Thr Pro Trp Tyr Leu Phe Glu Leu Phe Pro Phe Ile Leu Leu Gly Val				
ttt gga ggg ctt tgg gga gcc ttt ttc att agg gca aat att gcc tgg	400	405	410	1730
Phe Gly Gly Leu Trp Gly Ala Phe Phe Ile Arg Ala Asn Ile Ala Trp				
tgt cgt cga cgc aag tcc acg aaa ttt gga aag tat ccc gtt ctg gaa	415	420	425	1778
Cys Arg Arg Arg Lys Ser Thr Lys Phe Gly Lys Tyr Pro Val Leu Glu				
gtc att att gtt gca gcc att act gct gtg ata gcc ttc cct aat cca	435	440	445	1826
Val Ile Ile Val Ala Ala Ile Thr Ala Val Ile Ala Phe Pro Asn Pro				
tac act agg cta aac acc agt gaa ctg atc aaa gag ctt ttt aca gac	450	455	460	1874
Tyr Thr Arg Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ile Lys Glu Leu Phe Thr Asp				
tgt ggt ccc ctg gaa tcc tct tct ctt tgt gac tac aga aat gac atg	465	470	475	1922
Cys Gly Pro Leu Glu Ser Ser Ser Leu Cys Asp Tyr Arg Asn Asp Met				
aat gcc agt aaa att gtc gat gac att cct gat cgt cca gca ggc att	480	485	490	1970
Asn Ala Ser Lys Ile Val Asp Asp Ile Pro Asp Arg Pro Ala Gly Ile				
gga gta tat tca gct ata tgg cag tta tgc ctg gca ctc ata ttt aaa	495	500	505	2018
Gly Val Tyr Ser Ala Ile Trp Gln Leu Cys Leu Ala Leu Ile Phe Lys				
atc ata atg aca gta ttc act ttt ggc atc aag gtt cca tca ggc ttg	515	520	525	2066
Ile Ile Met Thr Val Phe Thr Phe Gly Ile Lys Val Pro Ser Gly Leu				
ttc atc ccc agc atg gcc att gga gcg atc gca gga agg att gtg ggg	530	535	540	2114
Phe Ile Pro Ser Met Ala Ile Gly Ala Ile Ala Gly Arg Ile Val Gly				
att gcg gtg gag cag ctt gcc tac tat cac cac gac tgg ttt atc ttt	545	550	555	2162
Ile Ala Val Glu Gln Leu Ala Tyr Tyr His His Asp Trp Phe Ile Phe				
aag gag tgg tgt gag gtc ggg gct gat tgc att aca cct ggc ctt tat				2210

Lys	Glu	Trp	Cys	Glu	Val	Gly	Ala	Asp	Cys	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Tyr
560						565					570				
gcc	atg	gtt	ggc	gct	gca	tgc	tta	ggc	ggc	gtc	aca	aga	atg	act	2258
Ala	Met	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr
575						580				585					590
gtc	tcc	ctg	gtg	gtt	att	gtt	ttt	gag	ctt	act	gga	ggc	ttg	gaa	tat
Val	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Val	Phe	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr
					595				600				605		
att	gtt	ccc	ctt	atg	gct	gca	gtc	atg	acc	agt	aaa	tgg	gtt	gga	gat
Ile	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Val	Met	Thr	Ser	Lys	Trp	Val	Gly	Asp
					610			615				620			
gcc	ttt	ggc	agg	gaa	ggc	att	tat	gaa	gca	cac	atc	cga	tta	aat	gga
Ala	Phe	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Glu	Ala	His	Ile	Arg	Leu	Asn	Gly
					625			630				635			
tac	cct	ttc	ttg	gat	gca	aaa	gaa	gaa	ttc	gaa	ttc	act	cat	acc	acc
Tyr	Pro	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	Glu	Phe	Glu	Phe	Thr	His	Thr	Thr
					640			645				650			
ctg	gct	gct	gac	gtt	atg	aga	cct	cga	agg	aat	gat	cct	ccc	tta	gct
Leu	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Asn	Asp	Pro	Pro	Leu	Ala
					655			660				665			670
gtc	ctg	aca	cag	gac	aat	atg	aca	gtg	gat	gat	ata	gaa	aac	atg	att
Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Asn	Met	Thr	Val	Asp	Asp	Ile	Glu	Asn	Met	Ile
					675			680				685			
aat	gaa	acc	agc	tac	aat	gga	ttt	cct	gtc	ata	atg	tca	aaa	gaa	tct
Asn	Glu	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Ile	Met	Ser	Lys	Glu	Ser
					690			695				700			
cag	aga	tta	gtg	gga	ttt	gcc	ctc	aga	aga	gac	ctg	aca	att	gca	ata
Gln	Arg	Leu	Val	Gly	Phe	Ala	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Ile	Ala	Ile
					705			710				715			
gaa	agt	gcc	agg	aaa	aaa	caa	gaa	ggc	atc	gtt	ggc	agt	tct	cgg	gtg
Glu	Ser	Ala	Arg	Lys	Lys	Gln	Glu	Gly	Ile	Val	Gly	Ser	Ser	Arg	Val
					720			725				730			
tgt	ttt	gca	cag	cac	acc	cca	tct	ctt	cca	gca	gaa	agt	cct	cgg	cca
Cys	Phe	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro
					735			740				745			750
ttg	aag	ctt	cga	agc	att	ctt	gac	atg	agc	cct	ttt	aca	gtg	aca	gac
Leu	Lys	Leu	Arg	Ser	Ile	Leu	Asp	Met	Ser	Pro	Phe	Thr	Val	Thr	Asp
					755			760				765			
cac	acc	cca	atg	gag	att	gtg	gtg	gat	att	ttc	cga	aag	ctg	gga	ctg
His	Thr	Pro	Met	Glu	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Lys	Leu	Gly	Leu
					770			775				780			
agg	cag	tgc	ctt	gta	act	cac	aat	ggg	cgc	ctc	ctt	ggc	att	ata	aca
Arg	Gln	Cys	Leu	Val	Thr	His	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Thr
					785			790				795			
aaa	aaa	gat	att	ctc	cg	cat	atg	gcc	cag	acg	gca	aac	caa	gac	ccc
Lys	Lys	Asp	Ile	Leu	Arg	His	Met	Ala	Gln	Thr	Ala	Asn	Gln	Asp	Pro
					800			805				810			
gct	tca	ata	atg	ttc	aac	tga	atctcacaga	tgaggagaga	gaagaaaacgg						2981
Ala	Ser	Ile	Met	Phe	Asn										
					815			820							
aagaggaagt	ttat	ttgt	tgat	gcac	aa	ctc	tttaacc	tgagg	gagtc	atct	actt	ttt	3041		

tttcctcct ttacaaaaaa agaaaggaaa tataaaagcc gggttttgc aacatggttt 3101
gcaaataatg ctggtgaaat ggaggagttg tttggggagg gaaaggagag agaaggaaag 3161
gagtgaggta tttccgtct aacagaaagc agcgtatcaa ctcctattgt tctgcactgg 3221
atgcattcag ctgaggatgt gcctgatagt gcaggcttgc gcctcaacag agatgacagc 3281
agagtcctcg agcacctggc ctgttgctc acatgcaaga cacatacagc cctattctag 3341
aggatacttgc aatggacctc tataaacgca aggttcttgc cttttttaa tcaaaactgt 3401
tctgttaat tcatgaattt gatagtaag cattacctt ctacatcca gaagagcctt 3461
tatttctctc tctctctctc tctctctact gagctgtaac aaagcctctt 3521
taaatcggtg tatccttttgc aagcgttgc ttctcatatt gagatgtact gtgattttac 3581
tgaggtttca tcacaagaag ggagtgttgc ttgtgccatt aaccatgttag ttgttaccat 3641
cactaaatgc ttggaacagt acacatgcac cacaacaaag gctcatcaaa caggtaaagt 3701
ctcgaaggaa gcgagaacga aatctctcat tgggtgtccgt gtggctcaaa accgaaaaca 3761
atgaagcttgc gttttaaagg ataaagttt cttttttttt ttcctctcactt actttatgg 3821
taatgtgacc gggctttatgc caaatttttctt atttctaaaa ctactactat gatatacaag 3881
tgctgttgag cataattaaa taaaatgctg ctgctttgac agtaaagaga aggaagtatt 3941
ctgaaaaaaaaa ac 3953

<210> 2
<211> 820
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Glu Ser Glu Gln Leu Phe His Arg Gly Tyr Tyr Arg Asn Ser Tyr
1 5 10 15
Asn Ser Ile Thr Ser Ala Ser Ser Asp Glu Glu Leu Leu Asp Gly Ala
20 25 30
Gly Val Ile Met Asp Phe Gln Thr Ser Glu Asp Asp Asn Leu Leu Asp
35 40 45
Gly Asp Thr Ala Val Gly Thr His Tyr Thr Met Thr Asn Gly Ser
50 55 60
Ile Asn Ser Ser Thr His Leu Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Ile Pro
65 70 75 80
Gly Val Gly Thr Tyr Asp Asp Phe His Thr Ile Asp Trp Val Arg Glu
85 90 95
Lys Cys Lys Asp Arg Glu Arg His Arg Arg Ile Asn Ser Lys Lys Lys
100 105 110
Glu Ser Ala Trp Glu Met Thr Lys Ser Leu Tyr Asp Ala Trp Ser Gly
115 120 125
Trp Leu Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly
130 135 140
Leu Ile Asp Ile Ala Ala Asp Trp Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Ile
145 150 155 160
Cys Leu Ser Ala Leu Trp Tyr Asn His Glu Gln Cys Cys Trp Gly Ser
165 170 175
Asn Glu Thr Thr Phe Glu Glu Arg Asp Lys Cys Pro Gln Trp Lys Thr
180 185 190
Trp Ala Glu Leu Ile Ile Gly Gln Ala Glu Gly Pro Gly Ser Tyr Ile
195 200 205
Met Asn Tyr Ile Met Tyr Ile Phe Trp Ala Leu Ser Phe Ala Phe Leu
210 215 220
Ala Val Ser Leu Val Lys Val Phe Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly
225 230 235 240

Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr
245 250 255
Leu Gly Lys Trp Thr Leu Met Ile Lys Thr Ile Thr Leu Val Leu Ala
260 265 270
Val Ala Ser Gly Leu Ser Leu Gly Lys Glu Gly Pro Leu Val His Val
275 280 285
Ala Cys Cys Cys Gly Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Phe Pro Lys Tyr Ser
290 295 300
Thr Asn Glu Ala Lys Lys Arg Glu Val Leu Ser Ala Ala Ser Ala Ala
305 310 315 320
Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser
325 330 335
Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser
340 345 350
Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Val Leu Arg Ser Ile Asn Pro
355 360 365
Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro
370 375 380
Trp Tyr Leu Phe Glu Leu Phe Pro Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly
385 390 395 400
Gly Leu Trp Gly Ala Phe Phe Ile Arg Ala Asn Ile Ala Trp Cys Arg
405 410 415
Arg Arg Lys Ser Thr Lys Phe Gly Lys Tyr Pro Val Leu Glu Val Ile
420 425 430
Ile Val Ala Ala Ile Thr Ala Val Ile Ala Phe Pro Asn Pro Tyr Thr
435 440 445
Arg Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ile Lys Glu Leu Phe Thr Asp Cys Gly
450 455 460
Pro Leu Glu Ser Ser Ser Leu Cys Asp Tyr Arg Asn Asp Met Asn Ala
465 470 475 480
Ser Lys Ile Val Asp Asp Ile Pro Asp Arg Pro Ala Gly Ile Gly Val
485 490 495
Tyr Ser Ala Ile Trp Gln Leu Cys Leu Ala Leu Ile Phe Lys Ile Ile
500 505 510
Met Thr Val Phe Thr Phe Gly Ile Lys Val Pro Ser Gly Leu Phe Ile
515 520 525
Pro Ser Met Ala Ile Gly Ala Ile Ala Gly Arg Ile Val Gly Ile Ala
530 535 540
Val Glu Gln Leu Ala Tyr Tyr His His Asp Trp Phe Ile Phe Lys Glu
545 550 555 560
Trp Cys Glu Val Gly Ala Asp Cys Ile Thr Pro Gly Leu Tyr Ala Met
565 570 575
Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu Gly Gly Val Thr Arg Met Thr Val Ser
580 585 590
Leu Val Val Ile Val Phe Glu Leu Thr Gly Gly Leu Glu Tyr Ile Val
595 600 605
Pro Leu Met Ala Ala Val Met Thr Ser Lys Trp Val Gly Asp Ala Phe
610 615 620
Gly Arg Glu Gly Ile Tyr Glu Ala His Ile Arg Leu Asn Gly Tyr Pro
625 630 635 640
Phe Leu Asp Ala Lys Glu Glu Phe Glu Phe Thr His Thr Thr Leu Ala
645 650 655
Ala Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Asn Asp Pro Pro Leu Ala Val Leu
660 665 670
Thr Gln Asp Asn Met Thr Val Asp Asp Ile Glu Asn Met Ile Asn Glu
675 680 685
Thr Ser Tyr Asn Gly Phe Pro Val Ile Met Ser Lys Glu Ser Gln Arg
690 695 700
Leu Val Gly Phe Ala Leu Arg Arg Asp Leu Thr Ile Ala Ile Glu Ser
705 710 715 720
Ala Arg Lys Lys Gln Glu Gly Ile Val Gly Ser Ser Arg Val Cys Phe
725 730 735
Ala Gln His Thr Pro Ser Leu Pro Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Lys
740 745 750
Leu Arg Ser Ile Leu Asp Met Ser Pro Phe Thr Val Thr Asp His Thr
755 760 765
Pro Met Glu Ile Val Val Asp Ile Phe Arg Lys Leu Gly Leu Arg Gln
770 775 780

Cys Leu Val Thr His Asn Gly Arg Leu Leu Gly Ile Ile Thr Lys Lys
785 790 795 800
Asp Ile Leu Arg His Met Ala Gln Thr Ala Asn Gln Asp Pro Ala Ser
805 810 815
Ile Met Phe Asn
820

<210> 3
<211> 2758
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> gene
<222> (1)..(2758)
<223> Clcn3

<220>
<221> CDS
<222> (376)..(2658)

<300>
<303> Genomics
<304> 1995
<305> 27 (1)
<306> 131-141

<300>
<308> Genbank/NM_007711 GI:6680947

<400> 3
gctggaggatgg gcggaggcggt gagaaccgcgt ttactttcct cccgaggtgg agagagactg 60
ctcctgttagt cctggagag cgcatgtggc ctccagtcgg ggcagaggcg gggtgggttg 120
agggcccgct ggagccgagg attgaacaac accctgaaac cagcctccgc cggtccgacc 180
tggccgcctt tacgttaacct ctcctgaaag ccggtagcag taaagtccgc cgggtggcc 240
acccggcagc ggtgtcccg tgaagctccc gggcggctg gcgcgcgatc gcaagcagat 300
gcggggtcca caggcagcgc agccaccagc cgccccagctt gctatgcctc tgagctgcaa 360
ggaactcatt ataca atg aca aat gga ggc agc att aat agc tct aca cac 411
Met Thr Asn Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser Thr His
1 5 10

ttg ctg gat ctt tta gat gag cct atc cca ggt gtc ggt acc tac gat 459
Leu Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Ile Pro Gly Val Gly Thr Tyr Asp
15 20 25

gat ttc cat act att gac tgg gtg cga gag aag tgt aag gac aga gaa 507
Asp Phe His Thr Ile Asp Trp Val Arg Glu Lys Cys Lys Asp Arg Glu
30 35 40

agg cac aga cgg atc aac agt aaa aaa aaa gaa tca gca tgg gaa atg 555
Arg His Arg Arg Ile Asn Ser Lys Lys Lys Glu Ser Ala Trp Glu Met
45 50 55 60

aca aaa agt ctg tat gac gcc tgg tca gga tgg ctt gtc gtt aca ctg 603
Thr Lys Ser Leu Tyr Asp Ala Trp Ser Gly Trp Leu Val Val Thr Leu
65 70 75

acg gga ctg gca tca ggg gca cta gct gga ttg ata gac att gct gct 651
Thr Gly Leu Ala Ser Gly Ala Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ile Ala Ala
80 85 90

gac tgg atg act gac ctg aag gag ggc atc tgc ctc agt gca ttg tgg Asp Trp Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Ile Cys Leu Ser Ala Leu Trp 95 100 105	699
tac aac cat gaa cag tgt tgg ggc tct aat gag aca acg ttt gaa Tyr Asn His Glu Gln Cys Cys Trp Gly Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu 110 115 120	747
gag agg gat aaa tgt cca cag tgg aaa aca tgg gca gag tta atc att Glu Arg Asp Lys Cys Pro Gln Trp Lys Thr Trp Ala Glu Leu Ile Ile 125 130 135 140	795
ggc caa gca gag ggc cct gga tct tat atc atg aac tac atc atg tat Gly Gln Ala Glu Gly Pro Gly Ser Tyr Ile Met Asn Tyr Ile Met Tyr 145 150 155	843
atc ttt tgg gct ttg agt ttt gcc ttt ctt gca gtt tct ttg gtg aaa Ile Phe Trp Ala Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Lys 160 165 170	891
gta ttt gct cca tat gcc tgt ggc tct gga att cca gag att aaa act Val Phe Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr 175 180 185	939
att ttg agt gga ttt atc atc aga gga tac ttg gga aaa tgg act tta Ile Leu Ser Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu 190 195 200	987
atg att aaa act atc acg tta gtg ctg gct gtg gca tca ggt ttg agt Met Ile Lys Thr Ile Thr Leu Val Leu Ala Val Ala Ser Gly Leu Ser 205 210 215 220	1035
tta gga aaa gaa ggt ccc ctg gta cat gtt gcc tgc tgc tgt gga aat Leu Gly Lys Glu Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn 225 230 235	1083
atc ttt tcc tac ctc ttt cca aag tat agc acc aat gaa gct aaa aag Ile Phe Ser Tyr Leu Phe Pro Lys Tyr Ser Thr Asn Glu Ala Lys Lys 240 245 250	1131
agg gag gtg ctg tca gcc tca gct gct ggg gtt tct gtg gct ttt Arg Glu Val Leu Ser Ala Ala Ser Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe 255 260 265	1179
ggt gca ccg atc gga gga gtt ctt ttt agc ttg gag gag gtt agc tat Gly Ala Pro Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr 270 275 280	1227
tat ttt cct ctc aaa act tta tgg aga tca ttt ttt gct gct ttg gtg Tyr Phe Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val 285 290 295 300	1275
gca gca ttt gtt ttg aga tcc atc aat cca ttt ggt aac agc cgt ctg Ala Ala Phe Val Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu 305 310 315	1323
gtc ctc ttt tat gtg gag tat cat aca cca tgg tac ctt ttt gaa ctg Val Leu Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Leu Phe Glu Leu 320 325 330	1371
ttt cct ttt att ctc cta ggg gta ttt gga ggg ctt tgg gga gct ttt Phe Pro Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Ala Phe 335 340 345	1419
ttt att agg gca aat att gcc tgg tgt cgt cga cgc aag tcc acc aaa Phe Ile Arg Ala Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Arg Lys Ser Thr Lys 350 355 360	1467
ttt gga aag tat cct gtt ctc gaa gtc att att gtt gca gcc att act	1515

Phe	Gly	Lys	Tyr	Pro	Val	Leu	Glu	Val	Ile	Ile	Val	Ala	Ala	Ile	Thr	
365					370					375					380	
gct	gtg	ata	gcc	ttc	ccc	aac	cca	tac	aca	agg	ctc	aac	acc	agt	gaa	1563
Ala	Val	Ile	Ala	Phe	Pro	Asn	Pro	Tyr	Thr	Arg	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	
					385				390					395		
ctg	att	aaa	gag	ctg	ttt	aca	gat	tgt	ggg	ccg	ttg	gaa	tcc	tcc	tct	1611
Leu	Ile	Lys	Glu	Leu	Phe	Thr	Asp	Cys	Gly	Pro	Leu	Glu	Ser	Ser	Ser	
					400				405					410		
ctc	tgt	gac	tac	aga	aat	gac	atg	aat	gcc	agt	aaa	att	gtt	gac	gat	1659
Leu	Cys	Asp	Tyr	Arg	Asn	Asp	Met	Asn	Ala	Ser	Lys	Ile	Val	Asp	Asp	
					415				420					425		
att	cct	gac	cgt	cca	gca	ggc	gtt	gga	gta	tat	tca	gct	atc	tgg	cag	1707
Ile	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Ser	Ala	Ile	Trp	Gln	
					430				435					440		
ttg	tgc	cta	gcg	ctc	ata	ttt	aaa	ata	ata	atg	aca	gta	ttc	act	ttt	1755
Leu	Cys	Leu	Ala	Leu	Ile	Phe	Lys	Ile	Ile	Met	Thr	Val	Phe	Thr	Phe	
					445				450					455		
ggt	atc	aag	gtc	ccg	tca	ggc	ttg	ttt	atc	ccc	agc	atg	gcc	att	gga	1803
Gly	Ile	Lys	Val	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	Ile	Pro	Ser	Met	Ala	Ile	Gly	
					465				470					475		
gcc	att	gca	ggg	aga	att	gtg	ggg	atc	gct	gtg	gag	cag	ctt	gcc	tac	1851
Ala	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Leu	Ala	Tyr	
					480				485					490		
tat	cac	cac	gac	tgg	ttt	atc	ttc	aag	gag	tgg	tgt	gag	gtt	ggg	gct	1899
Tyr	His	His	Asp	Trp	Phe	Ile	Phe	Lys	Glu	Trp	Cys	Glu	Val	Gly	Ala	
					495				500					505		
gac	tgc	atc	act	ccc	ggg	ctg	tat	gcc	atg	gtt	ggg	gct	gct	gcg	tgc	1947
Asp	Cys	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Tyr	Ala	Met	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Cys	
					510				515					520		
tta	ggg	gtt	gtg	aca	aga	atg	act	gtg	tct	ctg	gtg	gtt	att	gtt	ttt	1995
Leu	Gly	Gly	Val	Thr	Arg	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Val	Val	Ile	Val	Phe	
					525				530					535		
gaa	ctt	act	gga	ggc	ttg	gaa	tat	att	gtt	cct	ctt	atg	gct	gca	gta	2043
Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Ala	Val	
					545				550					555		
atg	acc	agt	aaa	tgg	gtt	ggt	gat	gcc	ttt	ggt	agg	gaa	ggt	att	tat	2091
Met	Thr	Ser	Lys	Trp	Val	Gly	Asp	Ala	Phe	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	
					560				565					570		
gaa	gca	cac	atc	cga	cta	aat	ggg	tac	cct	ttc	ttg	gat	gca	aaa	gaa	2139
Glu	Ala	His	Ile	Arg	Leu	Asn	Gly	Tyr	Pro	Phe	Leu	Asp	Ala	Lys	Glu	
					575				580					585		
gaa	ttc	act	cat	aca	acc	ctg	gct	gat	gtt	atg	aga	cct	cga	aga		2187
Glu	Phe	Thr	His	Thr	Thr	Leu	Ala	Ala	Asp	Val	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	
					590				595					600		
agt	gac	cct	ccc	tta	gct	gtt	ttg	aca	cag	gac	aat	atg	aca	gta	gat	2235
Ser	Asp	Pro	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Thr	Gln	Asp	Asn	Met	Thr	Val	Asp	
					605				610					615		
gac	ata	gaa	aac	atg	att	aat	gaa	acc	agc	tat	aat	ggc	ttt	cct	gtt	2283
Asp	Ile	Glu	Asn	Met	Ile	Asn	Glu	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	
					625				630					635		
ata	atg	tca	aaa	gaa	tct	cag	aga	tta	gtg	gga	ttt	gcc	ctc	aga	aga	2331

Ile Met Ser Lys Glu Ser Gln Arg Leu Val Gly Phe Ala Leu Arg Arg 640 645 650	
gac ctg act att gca ata gaa agt gcc aga aaa aaa caa gaa ggg att Asp Leu Thr Ile Ala Ile Glu Ser Ala Arg Lys Lys Gln Glu Gly Ile 655 660 665	2379
gtt ggc agt tct cgg gtg tgt ttt gca cag cat act cca tct ctt cca Val Gly Ser Ser Arg Val Cys Phe Ala Gln His Thr Pro Ser Leu Pro 670 675 680	2427
gca gaa agt cca cgg cca tta aaa ctg aga agc atc ctt gac atg agc Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Lys Leu Arg Ser Ile Leu Asp Met Ser 685 690 695 700	2475
cct ttt aca gtg aca gac cac acc cca atg gag att gtg gta gac atc Pro Phe Thr Val Thr Asp His Thr Pro Met Glu Ile Val Val Asp Ile 705 710 715	2523
ttt cga aag ctt ggt ctg agg cag tgc ctt gta act cac aac gga cgc Phe Arg Lys Leu Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr His Asn Gly Arg 720 725 730	2571
ctc ctt ggc att ata aca aaa aaa gat atc ctc cgt cat atg gcc cag Leu Leu Gly Ile Ile Thr Lys Lys Asp Ile Leu Arg His Met Ala Gln 735 740 745	2619
acg gca aac caa gac ccc gct tca ata atg ttc aac tga gtcctgtaga Thr Ala Asn Gln Asp Pro Ala Ser Ile Met Phe Asn 750 755 760	2668
tgaggacaga gaggagacag aagaggaagt tcgttgttgc aatagcacaa ttcttaatc tgccggactc gtccactttt ttcttcttgc	2728 2758

<210> 4
<211> 760
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Thr Asn Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser Thr His Leu Leu Asp Leu
1 5 10 15
Leu Asp Glu Pro Ile Pro Gly Val Gly Thr Tyr Asp Asp Phe His Thr
20 25 30
Ile Asp Trp Val Arg Glu Lys Cys Lys Asp Arg Glu Arg His Arg Arg
35 40 45
Ile Asn Ser Lys Lys Glu Ser Ala Trp Glu Met Thr Lys Ser Leu
50 55 60
Tyr Asp Ala Trp Ser Gly Trp Leu Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Ala
65 70 75 80
Ser Gly Ala Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ile Ala Ala Asp Trp Met Thr
85 90 95
Asp Leu Lys Glu Gly Ile Cys Leu Ser Ala Leu Trp Tyr Asn His Glu
100 105 110
Gln Cys Cys Trp Gly Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Glu Arg Asp Lys
115 120 125
Cys Pro Gln Trp Lys Thr Trp Ala Glu Leu Ile Ile Gly Gln Ala Glu
130 135 140
Gly Pro Gly Ser Tyr Ile Met Asn Tyr Ile Met Tyr Ile Phe Trp Ala
145 150 155 160
Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Lys Val Phe Ala Pro
165 170 175
Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser Gly
180 185 190
Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Met Ile Lys Thr
195 200 205

Ile Thr Leu Val Leu Ala Val Ala Ser Gly Leu Ser Leu Gly Lys Glu
210 215 220
Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Ile Phe Ser Tyr
225 230 235 240
Leu Phe Pro Lys Tyr Ser Thr Asn Glu Ala Lys Lys Arg Glu Val Leu
245 250 255
Ser Ala Ala Ser Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro Ile
260 265 270
Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe Pro Leu
275 280 285
Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Val
290 295 300
Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu Phe Tyr
305 310 315 320
Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Leu Phe Glu Leu Phe Pro Phe Ile
325 330 335
Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Ala Phe Phe Ile Arg Ala
340 345 350
Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Arg Lys Ser Thr Lys Phe Gly Lys Tyr
355 360 365
Pro Val Leu Glu Val Ile Ile Val Ala Ala Ile Thr Ala Val Ile Ala
370 375 380
Phe Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ile Lys Glu
385 390 395 400
Leu Phe Thr Asp Cys Gly Pro Leu Glu Ser Ser Ser Leu Cys Asp Tyr
405 410 415
Arg Asn Asp Met Asn Ala Ser Lys Ile Val Asp Asp Ile Pro Asp Arg
420 425 430
Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Ser Ala Ile Trp Gln Leu Cys Leu Ala
435 440 445
Leu Ile Phe Lys Ile Ile Met Thr Val Phe Thr Phe Gly Ile Lys Val
450 455 460
Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser Met Ala Ile Gly Ala Ile Ala Gly
465 470 475 480
Arg Ile Val Gly Ile Ala Val Glu Gln Leu Ala Tyr Tyr His His Asp
485 490 495
Trp Phe Ile Phe Lys Glu Trp Cys Glu Val Gly Ala Asp Cys Ile Thr
500 505 510
Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu Gly Gly Val
515 520 525
Thr Arg Met Thr Val Ser Leu Val Val Ile Val Phe Glu Leu Thr Gly
530 535 540
Gly Leu Glu Tyr Ile Val Pro Leu Met Ala Ala Val Met Thr Ser Lys
545 550 555 560
Trp Val Gly Asp Ala Phe Gly Arg Glu Gly Ile Tyr Glu Ala His Ile
565 570 575
Arg Leu Asn Gly Tyr Pro Phe Leu Asp Ala Lys Glu Glu Phe Thr His
580 585 590
Thr Thr Leu Ala Ala Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Ser Asp Pro Pro
595 600 605
Leu Ala Val Leu Thr Gln Asp Asn Met Thr Val Asp Asp Ile Glu Asn
610 615 620
Met Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Asn Gly Phe Pro Val Ile Met Ser Lys
625 630 635 640
Glu Ser Gln Arg Leu Val Gly Phe Ala Leu Arg Arg Asp Leu Thr Ile
645 650 655
Ala Ile Glu Ser Ala Arg Lys Lys Gln Glu Gly Ile Val Gly Ser Ser
660 665 670
Arg Val Cys Phe Ala Gln His Thr Pro Ser Leu Pro Ala Glu Ser Pro
675 680 685
Arg Pro Leu Lys Leu Arg Ser Ile Leu Asp Met Ser Pro Phe Thr Val
690 695 700
Thr Asp His Thr Pro Met Glu Ile Val Val Asp Ile Phe Arg Lys Leu
705 710 715 720
Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr His Asn Gly Arg Leu Leu Gly Ile
725 730 735
Ile Thr Lys Lys Asp Ile Leu Arg His Met Ala Gln Thr Ala Asn Gln
740 745 750

Asp Pro Ala Ser Ile Met Phe Asn
755 760

<210> 5
<211> 2588
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```
<220>
<221> gene
<222> (1)..(2588)
<223> CLCN4
```

<220>
<221> CDS
<222> (51)..(2051)
<223> C1C-4

<300>
<308> GenBank/XM_010391 GI:11421729

```
<400> 5
tacttcttcc aggcacccttg gctggggtca tcgatctcgc cgtggactgg atg acg      56
                                         Met Thr
                                         1
```

gac ctg aag gag ggg gtc tgc ctg tct gcc ttc tgg tat agc cat gag	104		
Asp Leu Lys Glu Gly Val Cys Leu Ser Ala Phe Trp Tyr Ser His Glu			
5	10	15	

cag tgt tgc tgg act tct aac gag acc act ttt gag gag gac aga gac aag 152
 Gln Cys Trp Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Asp Arg Asp Lys
 20 25 30

```

tgt ccc ctg tgg cag aaa tgg tcg gag ctg ctg gtg aat cag tca gag 200
Cys Pro Leu Trp Gln Lys Trp Ser Glu Leu Leu Val Asn Gln Ser Glu
      35           40           45           50

```

```

ggt gcc agt gct tac att ctg aat tac tta atg tac atc cta tgg gcg 248
Gly Ala Ser Ala Tyr Ile Leu Asn Tyr Leu Met Tyr Ile Leu Trp Ala
      55          60          65

```

ctg ctg ttt gca ttt ttg gct gtc tcc ctg gtg cgt gta ttt gca cca 296
 Leu Leu Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Arg Val Phe Ala Pro
 70 75 80

tat gcc tgt ggc tct ggc ata cca gag ata aag acc att ttg agc ggc 344
 Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu Ser Gly
 85 90 95

ttt atc atc agg ggc tac ttg ggg aag tgg acc ctg cta atc aag aca 392
Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Leu Ile Lys Thr
100 105 110

```

gtc acg ctg gtg ctg gta gtg tcc tcc ggt ctg agc ctt ggg aag gaa 440
Val Thr Leu Val Leu Val Val Ser Ser Gly Leu Ser Leu Gly Lys Glu
115           120           125           130

```

ggg ccg cta gtg cac gtg gct tgt tgc tgt ggc aac ttc ttc agc agc 488
 Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Phe Phe Ser Ser
 135 140 145

ctt ttc tcc aag tac agc aag aat gag ggc aag agg cg^g gag gtg ctt 536
 Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gly Lys Arg Arg Glu Val Leu
 150 155 160

tca gct gca gcg gct gct gga gtc tct gtt gcc ttt ggt gca cca att 584

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala Pro Ile			
165	170	175	
gga ggc gtg ctt ttc agt cta gaa gag gtc agt tac tac ttt ccc ctg			632
Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe Pro Leu			
180	185	190	
aag acc ttg tgg agg tca ttt ttc gca gcc ctg gtg gcg gcc ttt acg			680
Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Thr			
195	200	205	210
ctg aga tcc atc aat ccc ttt ggg aat agc cgt ctc gtt ctc ttt tat			728
Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu Phe Tyr			
215	220	225	
gtg gaa tac cac acg ccc tgg tac atg gct gaa ctc ttc ccc ttc atc			776
Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Met Ala Glu Leu Phe Pro Phe Ile			
230	235	240	
ctg ctt ggg gtc ttc ggg ggc ttg tgg gga acc ctc ttc atc cgc tgc			824
Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Thr Leu Phe Ile Arg Cys			
245	250	255	
aac atc gcc tgg tgc agg agg cgc aag acc acc acc agg ctc ggg aag tac			872
Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Arg Lys Thr Thr Arg Leu Gly Lys Tyr			
260	265	270	
ccg gtg ctg gag gtc att gtg gtg act gcc atc act gcc atc att gcc			920
Pro Val Leu Glu Val Ile Val Val Thr Ala Ile Thr Ala Ile Ile Ala			
275	280	285	290
tac ccc aat ccc tac aca cgc cag agc acc agc gag ctc att tct gag			968
Tyr Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile Ser Glu			
295	300	305	
ctg ttc aat gac tgt gga gcc ctt gag tct tcc cag ctc tgt gac tac			1016
Leu Phe Asn Asp Cys Gly Ala Leu Glu Ser Ser Gln Leu Cys Asp Tyr			
310	315	320	
atc aat gac ccc aac atg act cgg cct gtg gat gac att cca gac cgg			1064
Ile Asn Asp Pro Asn Met Thr Arg Pro Val Asp Asp Ile Pro Asp Arg			
325	330	335	
ccg gct ggt gtc ggt gtt tac acg gcc atg tgg cag ctg gcc ctg gca			1112
Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Thr Ala Met Trp Gln Leu Ala Leu Ala			
340	345	350	
ctg atc ttc aaa atc gtc gtt acc ata ttt acc ttt ggc atg aag atc			1160
Leu Ile Phe Lys Ile Val Val Thr Ile Phe Thr Phe Gly Met Lys Ile			
355	360	365	370
ccg tcg ggc ctc ttc atc ccc agc atg gct gtg ggc ggc ata gcg ggc			1208
Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser Met Ala Val Gly Ala Ile Ala Gly			
375	380	385	
agg atg gtg gga att ggc gtg gag cag ctg gcc tac cat cac cat gac			1256
Arg Met Val Gly Ile Gly Val Glu Gln Leu Ala Tyr His His His Asp			
390	395	400	
tgg atc atc ttc agg aac tgg tgc aga ccc ggt gca gac tgt gtc acg			1304
Trp Ile Ile Phe Arg Asn Trp Cys Arg Pro Gly Ala Asp Cys Val Thr			
405	410	415	
cca ggg ctg tac gca atg gtg gga gct gcg gcc tgc ctc ggt gga gtt			1352
Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu Gly Gly Val			
420	425	430	
acc agg atg acg gtg tca ttg gtg gtc atc atg ttt gaa tta acc ggg			1400

Thr Arg Met Thr Val Ser Leu Val Val Ile Met Phe Glu Leu Thr Gly	450	
435 440 445 450		
ggt ctg gag tac atc gtc ccc ctg atg gcg gcg gct gtc acc agc aag	1448	
Gly Leu Glu Tyr Ile Val Pro Leu Met Ala Ala Ala Val Thr Ser Lys	465	
455 460 465		
tgg gta gct gat gca ttt ggg aaa gaa ggc atc tac gag gcc cac atc	1496	
Trp Val Ala Asp Ala Phe Gly Lys Glu Gly Ile Tyr Glu Ala His Ile	480	
470 475 480		
cac tta aat ggg tac cct ttc ctt gac gtc aag gac gag ttt act cac	1544	
His Leu Asn Gly Tyr Pro Phe Leu Asp Val Lys Asp Glu Phe Thr His	495	
485 490 495		
cgc aca ctg gcc acc gac gtc atg cgg ccc cgg cgg gga gag ccg cca	1592	
Arg Thr Leu Ala Thr Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Gly Glu Pro Pro	510	
500 505 510		
ctg tcg gtg ctc acc cag gac agc atg act gtc gag gac gtg gag acg	1640	
Leu Ser Val Leu Thr Gln Asp Ser Met Thr Val Glu Asp Val Glu Thr	530	
515 520 525 530		
ctc atc aag gag acc gac tac aac ggc ttc ccc gtg gtg gtc tcc aga	1688	
Leu Ile Lys Glu Thr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Val Val Val Ser Arg	545	
535 540 545		
gac tcc gag cgc ctc att gga ttt gcc cag agg agg gaa ctg att ctc	1736	
Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Phe Ala Gln Arg Arg Glu Leu Ile Leu	560	
550 555 560		
gca ata aag aac gcc aga cag agg cag gag ggc att gtg agc aat tcc	1784	
Ala Ile Lys Asn Ala Arg Gln Arg Gln Glu Gly Ile Val Ser Asn Ser	575	
565 570 575		
atc atg tac ttc acg gag gaa ccc ccc gag ctg ccg gcc aac agc cca	1832	
Ile Met Tyr Phe Thr Glu Glu Pro Pro Glu Leu Pro Ala Asn Ser Pro	590	
580 585 590		
cat ccc ctg aag ctg cgg cgc atc ctg aac ctc agc ccg ttt aca gtg	1880	
His Pro Leu Lys Leu Arg Arg Ile Leu Asn Leu Ser Pro Phe Thr Val	610	
595 600 605 610		
aca gac cac act ccg atg gaa acg gtg gtg gat atc ttc ccg aaa ctg	1928	
Thr Asp His Thr Pro Met Glu Thr Val Val Asp Ile Phe Arg Lys Leu	625	
615 620 625		
ggg ctt cgg cag tgc ctg gtg acg cgg agc ggg aga ctt ctt ggc atc	1976	
Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr Arg Ser Gly Arg Leu Leu Gly Ile	640	
630 635 640		
atc aca aaa aag gat gtt ctg aga cat atg gcc cag atg gca aac cag	2024	
Ile Thr Lys Lys Asp Val Leu Arg His Met Ala Gln Met Ala Asn Gln	655	
645 650 655		
gac ccc gaa tcc atc atg ttt aat tag caacaagggtg gcaatttatttt	2071	
Asp Pro Glu Ser Ile Met Phe Asn	665	
660 665		
tcagaaaaac actgactgtg tcatttaaaa agaaaataaat gatatgttat tatcccaatg	2131	
aaagatcatg cattggggac agcagaaaaca aaagcttttt tgaaaaaggcg gggagaagg	2191	
atgaaaacctt taaaaacaaa aacaaaaaca tcaatgagta ggcattttat agctttaacc	2251	
ccgtatgagt ttcaagctgt gttcctaatt gagtttgcta ctgctgtggg ggcattgtggg	2311	
tgggtaaatg atgtaaatga tgtgatctgt acaagtatgt ggagcatgaa tgctgactca	2371	

agaaaactttt actccttctg ctcaaggctg atgtttgtaa cttatgaaca cacgtgaagt 2431
gtttagtcca aaagacaaag gggcatcgcc atgtcagcgt ctttatttat tggttcttga 2491
agtttgctg ctatgttact gaatcatact aaagacattt gcgcctactt tggtaaaaa 2551
gaaaaagaaa ttaaatttga acacagtcaa agctgca 2588

<210> 6
<211> 666
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Val Cys Leu Ser Ala Phe Trp Tyr Ser
1 5 10 15
His Glu Gln Cys Cys Trp Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Asp Arg
20 25 30
Asp Lys Cys Pro Leu Trp Gln Lys Trp Ser Glu Leu Leu Val Asn Gln
35 40 45
Ser Glu Gly Ala Ser Ala Tyr Ile Leu Asn Tyr Leu Met Tyr Ile Leu
50 55 60
Trp Ala Leu Leu Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Arg Val Phe
65 70 75 80
Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile Leu
85 90 95
Ser Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Leu Ile
100 105 110
Lys Thr Val Thr Leu Val Leu Val Val Ser Ser Gly Leu Ser Leu Gly
115 120 125
Lys Glu Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Phe Phe
130 135 140
Ser Ser Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gly Lys Arg Arg Glu
145 150 155 160
Val Leu Ser Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly Ala
165 170 175
Pro Ile Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr Phe
180 185 190
Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Ala Ala Leu Val Ala Ala
195 200 205
Phe Thr Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val Leu
210 215 220
Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Met Ala Glu Leu Phe Pro
225 230 235 240
Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Thr Leu Phe Ile
245 250 255
Arg Cys Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Lys Thr Thr Arg Leu Gly
260 265 270
Lys Tyr Pro Val Leu Glu Val Ile Val Val Thr Ala Ile Thr Ala Ile
275 280 285
Ile Ala Tyr Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile
290 295 300
Ser Glu Leu Phe Asn Asp Cys Gly Ala Leu Glu Ser Ser Gln Leu Cys
305 310 315 320
Asp Tyr Ile Asn Asp Pro Asn Met Thr Arg Pro Val Asp Asp Ile Pro
325 330 335
Asp Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Thr Ala Met Trp Gln Leu Ala
340 345 350
Leu Ala Leu Ile Phe Lys Ile Val Val Thr Ile Phe Thr Phe Gly Met
355 360 365
Lys Ile Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser Met Ala Val Gly Ala Ile
370 375 380
Ala Gly Arg Met Val Gly Ile Gly Val Glu Gln Leu Ala Tyr His His
385 390 395 400
His Asp Trp Ile Ile Phe Arg Asn Trp Cys Arg Pro Gly Ala Asp Cys
405 410 415
Val Thr Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu Gly
420 425 430

Gly Val Thr Arg Met Thr Val Ser Leu Val Val Ile Met Phe Glu Leu
435 440 445
Thr Gly Gly Leu Glu Tyr Ile Val Pro Leu Met Ala Ala Ala Val Thr
450 455 460
Ser Lys Trp Val Ala Asp Ala Phe Gly Lys Glu Gly Ile Tyr Glu Ala
465 470 475 480
His Ile His Leu Asn Gly Tyr Pro Phe Leu Asp Val Lys Asp Glu Phe
485 490 495
Thr His Arg Thr Leu Ala Thr Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Gly Glu
500 505 510
Pro Pro Leu Ser Val Leu Thr Gln Asp Ser Met Thr Val Glu Asp Val
515 520 525
Glu Thr Leu Ile Lys Glu Thr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Val Val Val
530 535 540
Ser Arg Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Phe Ala Gln Arg Arg Glu Leu
545 550 555 560
Ile Leu Ala Ile Lys Asn Ala Arg Gln Arg Gln Glu Gly Ile Val Ser
565 570 575
Asn Ser Ile Met Tyr Phe Thr Glu Glu Pro Pro Glu Leu Pro Ala Asn
580 585 590
Ser Pro His Pro Leu Lys Leu Arg Arg Ile Leu Asn Leu Ser Pro Phe
595 600 605
Thr Val Thr Asp His Thr Pro Met Glu Thr Val Val Asp Ile Phe Arg
610 615 620
Lys Leu Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr Arg Ser Gly Arg Leu Leu
625 630 635 640
Gly Ile Ile Thr Lys Lys Asp Val Leu Arg His Met Ala Gln Met Ala
645 650 655
Asn Gln Asp Pro Glu Ser Ile Met Phe Asn
660 665

<210> 7
<211> 2739
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> gene
<222> (1)..(2739)
<223> Clcn4-2

<220>
<221> CDS
<222> (378)..(2621)
<223> Clc 4-2

<300>
<303> Nat. Genet.
<304> 1995
<305> 10 (4)
<306> 466-471
<308> GenBank/NM_011334 GI:6755425

<400> 7
taaatgtgac ttaataaaatg gtgcggattt aaattttatt gcttgaggac agacggccat 60
aaaggaaggg aaaagacatt taatgtaaag gcaacaacaa caacaacaaa actgtcccgg 120
atgaggaagg catttaagtc atttcagcca agctgaacac ggagacaggg ggatgacgct 180
gaacacttgc cccgccccgc ctgcctgcct gtcacccgccc tcgcgcgtac gtcacacgac 240
ctgccgcaga cagccgcgct gaagagagga ggatgatcta ggacgcgttc cgggtggacg 300
gccacgcgc aagacgcggc cctgcaggag tgacttagcac ggtcaggcg ggagccacga 360

gcgcctctgg	gaacctc	atg	gac	ttc	ctc	gag	gag	ccc	ttc	cct	gac	gtg	410			
Met	Asp	Phe	Leu	Glu	Glu	Pro	Phe	Pro	Phe	Asp	Val					
1				5						10						
ggg	acc	tac	gag	gac	ttc	cac	acc	ata	gac	tgg	ctg	agg	gaa	aag	tcc	458
Gly	Thr	Tyr	Glu	Asp	Phe	His	Thr	Ile	Asp	Trp	Leu	Arg	Glu	Lys	Ser	
15								20					25			
cgg	gat	acc	gac	aga	cat	agg	aag	atc	acc	agc	aaa	agt	aag	gag	tct	506
Arg	Asp	Thr	Asp	Arg	His	Arg	Lys	Ile	Thr	Ser	Lys	Ser	Lys	Glu	Ser	
30								35				40				
att	tgg	gag	ttc	atc	aag	agc	ctg	ctg	gac	gcg	tgg	tcg	gga	tgg	gtg	554
Ile	Trp	Glu	Phe	Ile	Lys	Ser	Leu	Leu	Asp	Ala	Trp	Ser	Gly	Trp	Val	
45							50				55					
gtg	atg	cta	ctc	att	ggg	ctg	ctg	gca	ggt	acc	tta	gct	gga	gtc	atc	602
Val	Met	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Gly	Thr	Leu	Ala	Gly	Val	Ile	
60					65					70				75		
gat	ctc	gct	gtg	gat	tgg	atg	acg	gac	ctc	aag	gag	ggg	gtc	tgt	ctg	650
Asp	Leu	Ala	Val	Asp	Trp	Met	Thr	Asp	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Cys	Leu	
80							85						90			
tcc	gca	ttc	tgg	tac	agc	cat	gaa	cag	tgc	tgt	tgg	acc	tcc	aac	gag	698
Ser	Ala	Phe	Trp	Tyr	Ser	His	Glu	Gln	Cys	Cys	Trp	Thr	Ser	Asn	Glu	
95							100						105			
acc	act	ttt	gag	gac	agg	gac	aag	tgt	ccc	ctg	tgg	cag	aag	tgg	tca	746
Thr	Thr	Phe	Glu	Asp	Arg	Asp	Lys	Cys	Pro	Leu	Trp	Gln	Lys	Trp	Ser	
110							115					120				
gag	ctt	ctt	ctg	agc	cag	tca	gag	ggc	gcc	agc	gct	tac	att	ctg	aat	794
Glu	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Ala	Tyr	Ile	Leu	Asn	
125							130					135				
tac	tta	atg	tac	att	cta	tgg	gcg	ttg	ctg	ttt	gca	ttt	ctg	gct	gtc	842
Tyr	Leu	Met	Tyr	Ile	Leu	Trp	Ala	Leu	Leu	Phe	Ala	Phe	Leu	Ala	Val	
140						145					150				155	
tcc	ctg	gta	cgt	gtg	ttc	gca	ccg	tat	gcc	tgt	ggc	tct	ggc	ata	ccc	890
Ser	Leu	Val	Arg	Val	Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Cys	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	
160							165						170			
gag	ata	aag	act	att	ttg	agt	ggc	ttt	atc	atc	agg	ggc	tac	ttg	ggg	938
Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly	Phe	Ile	Ile	Arg	Gly	Tyr	Leu	Gly	
175							180						185			
aaa	tgg	act	ctt	cta	atc	aag	act	gtc	acc	ctc	gtg	ctc	gtc	gta	tcc	986
Lys	Trp	Thr	Leu	Leu	Ile	Lys	Thr	Val	Thr	Leu	Val	Leu	Val	Val	Ser	
190							195					200				
tct	ggc	ctg	agc	ctt	ggc	aaa	gag	ggc	cca	ctg	gtg	cat	gtg	gca	tgt	1034
Ser	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Leu	Val	His	Val	Ala	Cys	
205						210					215					
tgc	tgt	ggc	aac	ttc	ttc	agc	agc	ctt	tcc	tcc	aag	tat	agc	aag	aat	1082
Cys	Cys	Gly	Asn	Phe	Phe	Ser	Ser	Leu	Phe	Ser	Lys	Tyr	Ser	Lys	Asn	
220						225					230				235	
gaa	ggc	aag	agg	cgt	gag	gtg	ctt	tca	gct	gca	gct	gct	gct	ggt	gtc	1130
Glu	Gly	Lys	Arg	Arg	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	
240							245						250			
tct	gtg	gcc	ttt	ggt	gct	ccg	ata	gga	ggt	gtg	ctc	ttc	agt	cta	gag	1178
Ser	Val	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro	Ile	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	
255							260						265			
gag	gtc	agt	tac	tac	ttt	ccc	ttg	aaa	acc	ttg	tgg	agg	tca	ttc	ttt	1226

Glu Val Ser Tyr Tyr Phe Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe	270	275	280		
cga gcc ctg gtc gct gcc ttc aca ctg cgc tcc atc aac ccc ttt gga					1274
Arg Ala Leu Val Ala Ala Phe Thr Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly					
285	290	295			
aat agc cgc ctg gtt ctc ttt tac gtc gag tat cat aca ccc tgg tac					1322
Asn Ser Arg Leu Val Leu Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr					
300	305	310	315		
atg gct gaa ctc ttc cct ttc atc ctg ctt gga gtc ttt ggg ggt tta					1370
Met Ala Glu Leu Phe Pro Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu					
320	325	330			
tgg gga acc ctc ttc aca cgc tgc aac att gct tgg tgc agg agg cgt					1418
Trp Gly Thr Leu Phe Thr Arg Cys Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Arg					
335	340	345			
aag acc acc agg ctg ggc agg tac cca gtg ttg gag gtt att gcg gtg					1466
Lys Thr Thr Arg Leu Gly Arg Tyr Pro Val Leu Glu Val Ile Ala Val					
350	355	360			
aca gcc gtc acc gcc atc gtg gcc tac ccc aat ccc tac act cgc cag					1514
Thr Ala Val Thr Ala Ile Val Ala Tyr Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Gln					
365	370	375			
agc acc agt gag ctc atc tct gag ctc ttc aac gat tgt ggg gct ctc					1562
Ser Thr Ser Glu Leu Ile Ser Glu Leu Phe Asn Asp Cys Gly Ala Leu					
380	385	390	395		
gag tct tct cag ctc tgt gac tac atc aac gac ccc aac atg act cgg					1610
Glu Ser Ser Gln Leu Cys Asp Tyr Ile Asn Asp Pro Asn Met Thr Arg					
400	405	410			
cct gtg gat gac att ccg gac cgg cgg gct ggg gtt gga gtt tac aca					1658
Pro Val Asp Asp Ile Pro Asp Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Thr					
415	420	425			
gcc atg tgg cag ctg gcc ttg gca ctg tac ttc aaa ata gtc att act					1706
Ala Met Trp Gln Leu Ala Leu Ala Leu Tyr Phe Lys Ile Val Ile Thr					
430	435	440			
ata ttt acc ttt ggc atg aag att ccc tca ggt ctc ttc atc ccc agt					1754
Ile Phe Thr Phe Gly Met Lys Ile Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser					
445	450	455			
atg gct gtc gga gcc atg gca ggc cgg atg gtg gga atc ggt gtg gag					1802
Met Ala Val Gly Ala Met Ala Gly Arg Met Val Gly Ile Gly Val Glu					
460	465	470	475		
cag ctg gcc tac cat cac cat gac tgg atc atc ttc agg aac tgg tgc					1850
Gln Leu Ala Tyr His His Asp Trp Ile Ile Phe Arg Asn Trp Cys					
480	485	490			
agg cct gga gcg gac tgt gtc aca cca ggg ctt tat gcg atg gtg gga					1898
Arg Pro Gly Ala Asp Cys Val Thr Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly					
495	500	505			
gct gca gcc tgt cta ggt ggg gtg act agg atg aca gtg tct cta gtg					1946
Ala Ala Ala Cys Leu Gly Gly Val Thr Arg Met Thr Val Ser Leu Val					
510	515	520			
gtc att atg ttt gaa ctg act gga ggt ctg gag tat att gta ccc cta					1994
Val Ile Met Phe Glu Leu Thr Gly Gly Leu Glu Tyr Ile Val Pro Leu					
525	530	535			
atg gca gct gct gtc acc agc aag tgg gtg gct gat gcc ttt ggg aaa					2042

Met Ala Ala Ala Val Thr Ser Lys Trp Val Ala Asp Ala Phe Gly Lys 540 545 550 555	
gaa ggg att tat gaa gcc cac atc cat ctg aat ggg tac cca ttt ctt Glu Gly Ile Tyr Glu Ala His Ile His Leu Asn Gly Tyr Pro Phe Leu 560 565 570	2090
gat gtg aag gat gag ttc acc cac cgt acg ctg gcc act gat gtg atg Asp Val Lys Asp Glu Phe Thr His Arg Thr Leu Ala Thr Asp Val Met 575 580 585	2138
cgg ccc cgg agg gag gaa ccg cca tta tcg gta cta acc cag gac agc Arg Pro Arg Arg Glu Glu Pro Pro Leu Ser Val Leu Thr Gln Asp Ser 590 595 600	2186
atg act gtg gag gac gtg gag act ctc atc aag gag aca gac tac aac Met Thr Val Glu Asp Val Glu Thr Leu Ile Lys Glu Thr Asp Tyr Asn 605 610 615	2234
ggc ttt cct gtg ctc gtc tcc aga gac tcg gag cgt ctc atc ggg ttt Gly Phe Pro Val Leu Val Ser Arg Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Phe 620 625 630 635	2282
gcc cag agg cgg gag cta atc ttg gct ata aaa aat gcc agg cag agg Ala Gln Arg Arg Glu Leu Ile Leu Ala Ile Lys Asn Ala Arg Gln Arg 640 645 650	2330
caa gag ggc att gtg agc aat tcc atc atg tac ttc aca gag gag cct Gln Glu Gly Ile Val Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Thr Glu Glu Pro 655 660 665	2378
cct gag ctg cct gcc aac agc cca cat cca ctg aag ctg agg cgc att Pro Glu Leu Pro Ala Asn Ser Pro His Pro Leu Lys Leu Arg Arg Ile 670 675 680	2426
ttc aac ctg agc cct ttc acg gtc aca gat cac acc ccc atg gag acg Phe Asn Leu Ser Pro Phe Thr Val Thr Asp His Thr Pro Met Glu Thr 685 690 695	2474
gtg gtg gac att ttc cgg aaa ctg ggg ctc cga caa tgc ctg gtg aca Val Val Asp Ile Phe Arg Lys Leu Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr 700 705 710 715	2522
cgg agt ggg aga ctt ctt ggg atc atc aca aaa aag gat gtt ctg aga Arg Ser Gly Arg Leu Leu Gly Ile Ile Thr Lys Lys Asp Val Leu Arg 720 725 730	2570
cac atg gcc cag atg gca aac cag gac cct gaa tcc atc atg ttt aat His Met Ala Gln Met Ala Asn Gln Asp Pro Glu Ser Ile Met Phe Asn 735 740 745	2618
tag cactaagatg ggcattattt tgagaagtca ataattatat catttttaaaa	2671
gaaataacca agtgatatat tatgatccta atgaaaaaac ttgcactgaa ggcaaaaaaa	2731
aaaaaaaaa	2739
<210> 8	
<211> 747	
<212> PRT	
<213> Mus musculus	
<400> 8	
Met Asp Phe Leu Glu Glu Pro Phe Pro Asp Val Gly Thr Tyr Glu Asp 1 5 10 15	
Phe His Thr Ile Asp Trp Leu Arg Glu Lys Ser Arg Asp Thr Asp Arg 20 25 30	

His Arg Lys Ile Thr Ser Lys Ser Lys Glu Ser Ile Trp Glu Phe Ile
35 40 45
Lys Ser Leu Leu Asp Ala Trp Ser Gly Trp Val Val Met Leu Leu Ile
50 55 60
Gly Leu Leu Ala Gly Thr Leu Ala Gly Val Ile Asp Leu Ala Val Asp
65 70 75 80
Trp Met Thr Asp Leu Lys Glu Gly Val Cys Leu Ser Ala Phe Trp Tyr
85 90 95
Ser His Glu Gln Cys Cys Trp Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe Glu Asp
100 105 110
Arg Asp Lys Cys Pro Leu Trp Gln Lys Trp Ser Glu Leu Leu Ser
115 120 125
Gln Ser Glu Gly Ala Ser Ala Tyr Ile Leu Asn Tyr Leu Met Tyr Ile
130 135 140
Leu Trp Ala Leu Leu Phe Ala Phe Leu Ala Val Ser Leu Val Arg Val
145 150 155 160
Phe Ala Pro Tyr Ala Cys Gly Ser Gly Ile Pro Glu Ile Lys Thr Ile
165 170 175
Leu Ser Gly Phe Ile Ile Arg Gly Tyr Leu Gly Lys Trp Thr Leu Leu
180 185 190
Ile Lys Thr Val Thr Leu Val Leu Val Val Ser Ser Gly Leu Ser Leu
195 200 205
Gly Lys Glu Gly Pro Leu Val His Val Ala Cys Cys Cys Gly Asn Phe
210 215 220
Phe Ser Ser Leu Phe Ser Lys Tyr Ser Lys Asn Glu Gly Lys Arg Arg
225 230 235 240
Glu Val Leu Ser Ala Ala Ala Ala Gly Val Ser Val Ala Phe Gly
245 250 255
Ala Pro Ile Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Val Ser Tyr Tyr
260 265 270
Phe Pro Leu Lys Thr Leu Trp Arg Ser Phe Phe Arg Ala Leu Val Ala
275 280 285
Ala Phe Thr Leu Arg Ser Ile Asn Pro Phe Gly Asn Ser Arg Leu Val
290 295 300
Leu Phe Tyr Val Glu Tyr His Thr Pro Trp Tyr Met Ala Glu Leu Phe
305 310 315 320
Pro Phe Ile Leu Leu Gly Val Phe Gly Gly Leu Trp Gly Thr Leu Phe
325 330 335
Thr Arg Cys Asn Ile Ala Trp Cys Arg Arg Arg Lys Thr Thr Arg Leu
340 345 350
Gly Arg Tyr Pro Val Leu Glu Val Ile Ala Val Thr Ala Val Thr Ala
355 360 365
Ile Val Ala Tyr Pro Asn Pro Tyr Thr Arg Gln Ser Thr Ser Glu Leu
370 375 380
Ile Ser Glu Leu Phe Asn Asp Cys Gly Ala Leu Glu Ser Ser Gln Leu
385 390 395 400
Cys Asp Tyr Ile Asn Asp Pro Asn Met Thr Arg Pro Val Asp Asp Ile
405 410 415
Pro Asp Arg Pro Ala Gly Val Gly Val Tyr Thr Ala Met Trp Gln Leu
420 425 430
Ala Leu Ala Leu Tyr Phe Lys Ile Val Ile Thr Ile Phe Thr Phe Gly
435 440 445
Met Lys Ile Pro Ser Gly Leu Phe Ile Pro Ser Met Ala Val Gly Ala
450 455 460
Met Ala Gly Arg Met Val Gly Ile Gly Val Glu Gln Leu Ala Tyr His
465 470 475 480
His His Asp Trp Ile Ile Phe Arg Asn Trp Cys Arg Pro Gly Ala Asp
485 490 495
Cys Val Thr Pro Gly Leu Tyr Ala Met Val Gly Ala Ala Ala Cys Leu
500 505 510
Gly Gly Val Thr Arg Met Thr Val Ser Leu Val Val Ile Met Phe Glu
515 520 525
Leu Thr Gly Gly Leu Glu Tyr Ile Val Pro Leu Met Ala Ala Ala Val
530 535 540
Thr Ser Lys Trp Val Ala Asp Ala Phe Gly Lys Glu Gly Ile Tyr Glu
545 550 555 560
Ala His Ile His Leu Asn Gly Tyr Pro Phe Leu Asp Val Lys Asp Glu
565 570 575

Phe Thr His Arg Thr Leu Ala Thr Asp Val Met Arg Pro Arg Arg Glu
580 585 590
Glu Pro Pro Leu Ser Val Leu Thr Gln Asp Ser Met Thr Val Glu Asp
595 600 605
Val Glu Thr Leu Ile Lys Glu Thr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Val Leu
610 615 620
Val Ser Arg Asp Ser Glu Arg Leu Ile Gly Phe Ala Gln Arg Arg Glu
625 630 635 640
Leu Ile Leu Ala Ile Lys Asn Ala Arg Gln Arg Gln Glu Gly Ile Val
645 650 655
Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Thr Glu Glu Pro Pro Glu Leu Pro Ala
660 665 670
Asn Ser Pro His Pro Leu Lys Leu Arg Arg Ile Phe Asn Leu Ser Pro
675 680 685
Phe Thr Val Thr Asp His Thr Pro Met Glu Thr Val Val Asp Ile Phe
690 695 700
Arg Lys Leu Gly Leu Arg Gln Cys Leu Val Thr Arg Ser Gly Arg Leu
705 710 715 720
Leu Gly Ile Ile Thr Lys Lys Asp Val Leu Arg His Met Ala Gln Met
725 730 735
Ala Asn Gln Asp Pro Glu Ser Ile Met Phe Asn
740 745

<210> 9
<211> 5541
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(2636)
<223> ClC-6

<300>
<308> GenBank/X83378 GI:1154676

<300>
<303> FEBS Lett.
<304> 1995
<305> 377 (1)
<306> 15-20
<308> GenBank/Z67743 GI:1177439

<400> 9
gtccagagtgc cagtaaagg aggaag atg gcg ggg tgc agg ggg tct ctg tgc 53
Met Ala Gly Cys Arg Gly Ser Leu Cys
1 5
tgc tgc tgc agg tgg tgc tgc tgc ggt gag cgt gag acc cgc acc 101
Cys Cys Cys Arg Trp Cys Cys Cys Gly Glu Arg Glu Thr Arg Thr
10 15 20 25
ccc gag gag ctg acc atc ctt gga gaa aca cag gag gag gag gat gag 149
Pro Glu Glu Leu Thr Ile Leu Gly Glu Thr Gln Glu Glu Asp Glu
30 35 40
att ctt cca agg aaa gac tat gag agt ttg gat tat gat cgc tgt atc 197
Ile Leu Pro Arg Lys Asp Tyr Glu Ser Leu Asp Tyr Asp Arg Cys Ile
45 50 55
aat gac cct tac ctg gaa gtt ttg gag acc atg gat aat aag aaa ggt 245
Asn Asp Pro Tyr Leu Glu Val Leu Glu Thr Met Asp Asn Lys Lys Gly
60 65 70
cga aga tat gag gcg gtg aag tgg atg gtg gtg ttt gcc att gga gtc 293
Arg Arg Tyr Glu Ala Val Lys Trp Met Val Val Phe Ala Ile Gly Val
75 80 85

tgc act ggc ctg gtg ggt ctc ttt gtg gac	ttt ttt gtg cga ctc ttc	341
Cys Thr Gly Leu Val Gly Leu Phe Val Asp	Phe Phe Val Arg Leu Phe	
90 95 100 105		
acc caa ctc aag ttc gga gtg gta cag aca	tcg gtg gag gag tgc agc	389
Thr Gln Leu Lys Phe Gly Val Val Gln	Thr Ser Val Glu Glu Cys Ser	
110 115 120		
cag aaa ggc tgc ctc gct ctg tct ctc ctt	gaa ctc ctg ggt ttt aac	437
Gln Lys Gly Cys Leu Ala Leu Ser	Leu Leu Glu Leu Leu Gly Phe Asn	
125 130 135		
ctc acc ttt gtc ttc ctg gca agc ctc ctt	gtt ctc att gag ccg gtg	485
Leu Thr Phe Val Phe Leu Ala Ser	Leu Leu Val Leu Ile Glu Pro Val	
140 145 150		
gca gca ggt tcc ggg ata ccc gag gtc aaa	tgc tat ctg aat ggc gta	533
Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Glu Val Lys	Cys Tyr Leu Asn Gly Val	
155 160 165		
aag gtg cca gga atc gtc cgt ctc cgg acc	ctg ctc tgc aag gtc ctt	581
Lys Val Pro Gly Ile Val Arg Leu Arg	Thr Leu Leu Cys Lys Val Leu	
170 175 180 185		
gga gtg ctg ttc agt gtg gct gga ggg ctc	ttc gtg ggg aag gaa ggc	629
Gly Val Leu Phe Ser Val Ala Gly Gly	Leu Phe Val Gly Lys Glu Gly	
190 195 200		
ccc atg atc cac agt ggt tcg gtg gtg gga	gct ggc ctc cct cag ttt	677
Pro Met Ile His Ser Gly Ser Val Val Gly	Ala Gly Leu Pro Gln Phe	
205 210 215		
cag agc atc tcc tta cg ^g aag atc cag	ttt aac ttc ccc tat ttc cga	725
Gln Ser Ile Ser Leu Arg Lys Ile Gln Phe	Asn Phe Pro Tyr Phe Arg	
220 225 230		
agc gac aga gac aag aga gac ttt gta tca	gca gga gcg gct gct gga	773
Ser Asp Arg Asp Lys Arg Asp Phe Val Ser	Ala Gly Ala Ala Ala Gly	
235 240 245		
gtt gct gca gct ttc ggg gcg cca atc	ggg ggt acc ttg ttc agt cta	821
Val Ala Ala Ala Phe Gly Ala Pro Ile Gly	Gly Thr Leu Phe Ser Leu	
250 255 260 265		
gag gag ggt tcg tcc ttc tgg aaccaa	ggg ctc acg tgg aaa gtg ctc	869
Glu Glu Gly Ser Ser Phe Trp Asn Gln	Gly Leu Thr Trp Lys Val Leu	
270 275 280		
ttt tgt tcc atg tct gcc acc ttc acc ctc	aac ttc ttc cgt tct ggg	917
Phe Cys Ser Met Ser Ala Thr Phe Thr Leu	Asn Phe Phe Arg Ser Gly	
285 290 295		
att cag ttt gga agc tgg ggt tcc ttc cag	ctc cct gga ttg ctg aac	965
Ile Gln Phe Gly Ser Trp Gly Ser Phe Gln	Leu Pro Gly Leu Leu Asn	
300 305 310		
ttt ggc gag ttt aag tgc tct gac tct gat	aaa aaa tgt cat ctc tgg	1013
Phe Gly Glu Phe Lys Cys Ser Asp Ser Asp	Lys Lys Cys His Leu Trp	
315 320 325		
aca gct atg gat ttg ggt ttc ttc gtc gtg	atg ggg gtc att ggg ggc	1061
Thr Ala Met Asp Leu Gly Phe Phe Val Val	Met Gly Val Ile Gly Gly	
330 335 340 345		
ctc ctg gga gcc aca ttc aac tgt ctg aac	aag agg ctt gca aag tac	1109
Leu Leu Gly Ala Thr Phe Asn Cys Leu Asn	Lys Arg Leu Ala Lys Tyr	
350 355 360		
cgt atg cga aac gtg cac ccg aaa cct aag	ctc gtc aga gtc tta gag	1157

Arg	Met	Arg	Asn	Val	His	Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Val	Arg	Val	Leu	Glu	
365						370						375				
agc	ctc	ctt	gtg	tct	ctg	gta	acc	acc	gtg	gtg	gtg	ttt	gtg	gcc	tcg	1205
Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Val	Thr	Thr	Val	Val	Val	Phe	Val	Ala	Ser	
380						385						390				
atg	gtg	tta	gga	gaa	tgc	cga	cag	atg	tcc	tct	tcg	agt	caa	atc	ggt	1253
Met	Val	Leu	Gly	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Gly	
395						400						405				
aat	gac	tca	ttc	cag	ctc	cag	gtc	aca	gaa	gat	gtg	aat	tca	agt	atc	1301
Asn	Asp	Ser	Phe	Gln	Leu	Gln	Val	Thr	Glu	Asp	Val	Asn	Ser	Ser	Ile	
410						415					420				425	
aag	aca	ttt	ttt	tgt	ccc	aat	gat	acc	tac	aat	gac	atg	gcc	aca	ctc	1349
Lys	Thr	Phe	Phe	Cys	Pro	Asn	Asp	Thr	Tyr	Asn	Asp	Met	Ala	Thr	Leu	
						430					435				440	
ttc	ttc	aac	ccg	cag	gag	tct	gcc	atc	ctc	cag	ctc	ttc	cac	cag	gat	1397
Phe	Phe	Asn	Pro	Gln	Glu	Ser	Ala	Ile	Leu	Gln	Leu	Phe	His	Gln	Asp	
						445			450				455			
ggt	act	ttc	agc	ccc	gtc	act	ctg	gcc	ttg	ttc	ttc	gtt	ctc	tat	ttc	1445
Gly	Thr	Phe	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Phe	Phe	Val	Leu	Tyr	Phe	
						460			465			470				
ttg	ctt	gca	tgt	tgg	act	tac	ggc	att	tct	gtt	cca	agt	ggc	ctt	ttt	1493
Leu	Leu	Ala	Cys	Trp	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ser	Val	Pro	Ser	Gly	Leu	Phe	
						475			480			485				
gtg	cct	tct	ctg	ctg	tgt	gga	gct	gct	ttt	gga	cgt	tta	gtt	gcc	aat	1541
Val	Pro	Ser	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ala	Phe	Gly	Arg	Leu	Val	Ala	Asn	
						490			495			500			505	
gtc	cta	aaa	agc	tac	att	gga	ttg	ggc	cac	atc	tat	tcg	ggg	acc	ttt	1589
Val	Leu	Lys	Ser	Tyr	Ile	Gly	Leu	Gly	His	Ile	Tyr	Ser	Gly	Thr	Phe	
						510					515				520	
gcc	ctg	att	ggg	gca	gcg	gct	ttc	ttg	ggc	ggg	gtg	gtc	cgc	atg	acc	1637
Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Phe	Leu	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Met	Thr	
						525			530				535			
atc	agc	ctc	acg	gtc	atc	ctg	atc	gag	tcc	acc	aat	gag	atc	acc	tac	1685
Ile	Ser	Leu	Thr	Val	Ile	Leu	Ile	Glu	Ser	Thr	Asn	Glu	Ile	Thr	Tyr	
						540			545			550				
ggg	ctc	ccc	atc	atg	gtc	aca	ctg	atg	gtg	gcc	aaa	tgg	aca	ggg	gac	1733
Gly	Leu	Pro	Ile	Met	Val	Thr	Leu	Met	Val	Ala	Lys	Trp	Thr	Gly	Asp	
						555			560			565				
ttt	ttc	aat	aag	ggc	att	tat	gat	atc	cac	gtg	ggc	ctg	cga	ggc	gtg	1781
Phe	Phe	Asn	Lys	Gly	Ile	Tyr	Asp	Ile	His	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Val	
						570			575			580			585	
ccg	ctt	ctg	gaa	tgg	gag	aca	gag	gtg	gaa	atg	gac	aag	ctg	aga	gcc	1829
Pro	Leu	Leu	Glu	Trp	Glu	Thr	Glu	Val	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Ala	
						590					595				600	
agc	gac	atc	atg	gag	ccc	aac	ctg	acc	tac	gtc	tac	ccg	cac	acc	cgc	1877
Ser	Asp	Ile	Met	Glu	Pro	Asn	Leu	Thr	Tyr	Val	Tyr	Pro	His	Thr	Arg	
						605			610			615				
atc	cag	tct	ctg	gtg	agc	atc	ctg	cgc	acc	acg	gtc	cac	cat	gcc	ttc	1925
Ile	Gln	Ser	Leu	Val	Ser	Ile	Leu	Arg	Thr	Thr	Val	His	His	Ala	Phe	
						620			625			630				
ccg	gtg	gtc	aca	gag	aac	cgc	ggt	aac	gag	aag	gag	ttc	atg	aag	ggc	1973

Pro Val Val Thr Glu Asn Arg Gly Asn Glu Lys Glu Phe Met Lys Gly	635 640 645	
aac cag ctc atc agc aac aac atc aag ttc aag aaa tcc agc atc ctc Asn Gln Leu Ile Ser Asn Asn Ile Lys Phe Lys Lys Ser Ser Ile Leu	650 655 660 665	2021
acc cgg gct ggc gag cag cgc aaa cgg agc cag tcc atg aag tcc tac Thr Arg Ala Gly Glu Gln Arg Lys Arg Ser Gln Ser Met Lys Ser Tyr	670 675 680	2069
cca tcc agc gag cta cgg aac atg tgt gat gag cac atc gcc tct gag Pro Ser Ser Glu Leu Arg Asn Met Cys Asp Glu His Ile Ala Ser Glu	685 690 695	2117
gag cca gcc gag aag gag gac ctc ctg cag cag atg ctg gaa agg aga Glu Pro Ala Glu Lys Glu Asp Leu Leu Gln Gln Met Leu Glu Arg Arg	700 705 710	2165
tac act ccc tac ccc aac cta tac cct gac cag tcc cca agt gaa gac Tyr Thr Pro Tyr Pro Asn Leu Tyr Pro Asp Gln Ser Pro Ser Glu Asp	715 720 725	2213
tgg acc atg gag gag cgg ttc cgc cct ctg acc ttc cac ggc ctg atc Trp Thr Met Glu Glu Arg Phe Arg Pro Leu Thr Phe His Gly Leu Ile	730 735 740 745	2261
ctt cgg tcg cag ctt gtc acc ctg ctt gtc cga gga gtt tgt tac tct Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr Leu Leu Val Arg Gly Val Cys Tyr Ser	750 755 760	2309
gaa agc cag tcg agc gcc agc cag ccg cgc ctc tcc tat gcc gag atg Glu Ser Gln Ser Ser Ala Ser Gln Pro Arg Leu Ser Tyr Ala Glu Met	765 770 775	2357
gcc gag gac tac ccg cgg tac ccc gac atc cac gac ctg gac ctg acg Ala Glu Asp Tyr Pro Arg Tyr Pro Asp Ile His Asp Leu Asp Leu Thr	780 785 790	2405
ctg ctc aac ccg cgc atg atc gtg gat gtc acc cca tac atg aac cct Leu Leu Asn Pro Arg Met Ile Val Asp Val Thr Pro Tyr Met Asn Pro	795 800 805	2453
tcg cct ttc acc gtc tcg ccc aac acc cac gtc tcc caa gtc ttc aac Ser Pro Phe Thr Val Ser Pro Asn Thr His Val Ser Gln Val Phe Asn	810 815 820 825	2501
ctg ttc aga acg atg ggc ctg cgc cac ctg ccc gtg gtg aac gct gtg Leu Phe Arg Thr Met Gly Leu Arg His Leu Pro Val Val Asn Ala Val	830 835 840	2549
gga gag atc gtg ggg atc atc aca cgg cac aac ctc acc tat gaa ttt Gly Glu Ile Val Gly Ile Ile Thr Arg His Asn Leu Thr Tyr Glu Phe	845 850 855	2597
ctg cag gcc cgg ctg agg cag cac tac cag acc atc tga cagccagcc Leu Gln Ala Arg Leu Arg Gln His Tyr Gln Thr Ile	860 865 870	2646
caccctctcc tggtgctgcc tggggaggca aatcatgctc actccggcg ggacagctgg	2706	
ctggggctgt tccggggcat ggaagattcc cagttaccca ctcactcaga aagccggag	2766	
tcatcgaca cttgctggt cagagggccct ggggtggtt ttgaaccatc agagcttgg	2826	
cttttctgac ttccccagca aggatcttcc cacttcctgc tccctgtgtt cccaccctcc	2886	
agtgttggca caggcccacc cctggctcca ccagagccag aagcagaggt agaatcaggc	2946	

gggccccggg ctgcactccg agcagtgtt cttggccatct ttgctacttt cctagagaac 3006
ccggctgttgc ctttaaatgt gtgagagggaa cttggccaag gcaaaagctg gggagatgcc 3066
agtgacaaca tacagttcat gactaggttt aggaattggg cactgagaaaa attctcaata 3126
tttcagagag tccttccctt atttgggact cctaacacgg tattcctcgct agtttggttt 3186
aaggaaaca ctctgctctt ggggtgtgagc agaggctctg gtcttgcctt gtgggttgac 3246
tctccttaga accaccgccc accagaaaaca taaaggatta aaatcacact aataaccctt 3306
ggatggtcaa tctgataata ggatcagatt tacgtctacc ctaattctta acattgcagc 3366
tttctctcca tctgcagatt attccagtc tccagtaac acgtttctac ccagatcctt 3426
tttcatttcc ttaagttttg atctccgtct tcctgatgaa gcaggcagag ctcagaggat 3486
cttggcatca cccacccaaag ttagctgaaa gcagggcaact cctggataaa gcagcttcac 3546
tcaactctgg ggaatgctac catttttttt ccaaagttaga aaggaagcac ttctgagcca 3606
gtgaccactg aaaggtatgt gctatgataa agcagatggc ctatttgagg aagaggggt 3666
ctgcccctca caaacacccctc tctctccctt gcactagctg tcccaagctt acatacagag 3726
gcccttcagg agggcctcctt gtgccgcagg gaggggtgcgt ggggaagatg ctccctgcca 3786
gcacgtgcctt gaagggttca catgaagcat gggaaagcgca ccctgtcggt cagtgacgtc 3846
attcttctcc aggctggccc gccccctctg actaggcacc caaagttagc atctgggcat 3906
tgggcattca tgcttatctt cccccacctt ctacatggta tcagtcccag caggcatccc 3966
tggggcagac gtgcttgcc tcaagatggc cttcatttac gtttagttt ttttaaaacc 4026
gtggaggttgc cccacgggccc tcggcacctg gccctggcag cacagctctc aggcccagcc 4086
ctgggcgacc tccttggcca agtctgcctt tcaccctggg gtgagcatca gtccctggctc 4146
tgctggtcca gatcttgcgc tcagcacact cttaggaata attccactcc agagatgggg 4206
ctgcttcaag gtctttcttca gctgattgtg gccctccat tttcccttattt ttcttatctc 4266
cctgaccaaa attgcttga cttctaaatgt tttctgcttc ccagaatgca cctgacttat 4326
gaaatgggaa taataactccc aggaaatagc gcaggacatc acaaggacca aaaaggcaat 4386
tcttatttaa atgttactat ttggccagct gctgctgtgt tttatggcag tggtagcagc 4446
ttgatcacgt tatttcttcc ttttatttaag aaggaagccaa attgtccaag tcaggagaat 4506
ggtgtgatca cctgtcacag acactttgtc ccctctcccc gccccttcctt ggagctggca 4566
gagctaacgc cctgcaggag gacccggcc tctcgagggc tggatcagca gccgcctgccc 4626
ctgaggctgc cccggtaat gttattggaa ttcatccctc gtgcacatcc tggatgtttt 4686
aagtccaccaat atattttgtt cccatcagtt tagcccagag atagacagta gaatgcaaat 4746
acctccctcc cctaaactga ctggacggct gccaaggagg ccccaaacc agggccatg 4806
caaaggcacg tggttccctt ttctcccttc tctgcacatcg cgctttccag ataagcccaa 4866
agacagcaac ttctccactc atgacaaatc aactgtgacc ctgcctccctt ccatttctgt 4926
ccatttagaaa ccagcctttt cagcatctca cccatttagca gccccatcac ccagtgatca 4986
gtcgccctcag taaagcagat ctgtggatgg ggagcctacg ggtggtaaga agtgggtttt 5046

tgtgttcat ctccagcttgcgttccatg gcccctaggc gaggtgatca gggagtgggg 5106
ccaatgggcc cccggccctg gctttgggac ctgtgtcgatca gggatgattt gtcctgacc 5166
ttgattaact taacagttcc cagctgaaag ggacacttcc aggacccagt ccactgtatg 5226
gcatttgtga tgcagaattt tgcaactgaca tgaccctggg tgacaggaaa gccttcgag 5286
aggcccaagg tggcctcgcc agccctgcag tattgatgtc cagtattgca ccacagctct 5346
gcggaccccttgcgttcc cagtcgcagc ttccctttt ctgttgac tgggg 5406
tatgtatgtta gctaattcca ctgtgtatataattttttaatt tgaaaaatgc 5466
tattttatt tgaaccttttgaacttggga gttctcatttgaaccctaactatgtgagaat 5526
aaaatgtctt ctgtc 5541

<210> 10
<211> 869
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Ala Gly Cys Arg Gly Ser Leu Cys Cys Cys Arg Trp Cys Cys
1 5 10 15
Cys Cys Gly Glu Arg Glu Thr Arg Thr Pro Glu Glu Leu Thr Ile Leu
20 25 30
Gly Glu Thr Gln Glu Glu Asp Glu Ile Leu Pro Arg Lys Asp Tyr
35 40 45
Glu Ser Leu Asp Tyr Asp Arg Cys Ile Asn Asp Pro Tyr Leu Glu Val
50 55 60
Leu Glu Thr Met Asp Asn Lys Lys Gly Arg Arg Tyr Glu Ala Val Lys
65 70 75 80
Trp Met Val Val Phe Ala Ile Gly Val Cys Thr Gly Leu Val Gly Leu
85 90 95
Phe Val Asp Phe Phe Val Arg Leu Phe Thr Gln Leu Lys Phe Gly Val
100 105 110
Val Gln Thr Ser Val Glu Glu Cys Ser Gln Lys Gly Cys Leu Ala Leu
115 120 125
Ser Leu Leu Glu Leu Leu Gly Phe Asn Leu Thr Phe Val Phe Leu Ala
130 135 140
Ser Leu Leu Val Leu Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro
145 150 155 160
Glu Val Lys Cys Tyr Leu Asn Gly Val Lys Val Pro Gly Ile Val Arg
165 170 175
Leu Arg Thr Leu Leu Cys Lys Val Leu Gly Val Leu Phe Ser Val Ala
180 185 190
Gly Gly Leu Phe Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser
195 200 205
Val Val Gly Ala Gly Leu Pro Gln Phe Gln Ser Ile Ser Leu Arg Lys
210 215 220
Ile Gln Phe Asn Phe Pro Tyr Phe Arg Ser Asp Arg Asp Lys Arg Asp
225 230 235 240
Phe Val Ser Ala Gly Ala Ala Gly Val Ala Ala Ala Phe Gly Ala
245 250 255
Pro Ile Gly Gly Thr Leu Phe Ser Leu Glu Glu Gly Ser Ser Phe Trp
260 265 270
Asn Gln Gly Leu Thr Trp Lys Val Leu Phe Cys Ser Met Ser Ala Thr
275 280 285
Phe Thr Leu Asn Phe Phe Arg Ser Gly Ile Gln Phe Gly Ser Trp Gly
290 295 300
Ser Phe Gln Leu Pro Gly Leu Leu Asn Phe Gly Glu Phe Lys Cys Ser
305 310 315 320
Asp Ser Asp Lys Lys Cys His Leu Trp Thr Ala Met Asp Leu Gly Phe
325 330 335
Phe Val Val Met Gly Val Ile Gly Gly Leu Leu Gly Ala Thr Phe Asn
340 345 350

Cys Leu Asn Lys Arg Leu Ala Lys Tyr Arg Met Arg Asn Val His Pro
355 360 365
Lys Pro Lys Leu Val Arg Val Leu Glu Ser Leu Leu Val Ser Leu Val
370 375 380
Thr Thr Val Val Val Phe Val Ala Ser Met Val Leu Gly Glu Cys Arg
385 390 395 400
Gln Met Ser Ser Ser Gln Ile Gly Asn Asp Ser Phe Gln Leu Gln
405 410 415
Val Thr Glu Asp Val Asn Ser Ser Ile Lys Thr Phe Phe Cys Pro Asn
420 425 430
Asp Thr Tyr Asn Asp Met Ala Thr Leu Phe Phe Asn Pro Gln Glu Ser
435 440 445
Ala Ile Leu Gln Leu Phe His Gln Asp Gly Thr Phe Ser Pro Val Thr
450 455 460
Leu Ala Leu Phe Phe Val Leu Tyr Phe Leu Leu Ala Cys Trp Thr Tyr
465 470 475 480
Gly Ile Ser Val Pro Ser Gly Leu Phe Val Pro Ser Leu Leu Cys Gly
485 490 495
Ala Ala Phe Gly Arg Leu Val Ala Asn Val Leu Lys Ser Tyr Ile Gly
500 505 510
Leu Gly His Ile Tyr Ser Gly Thr Phe Ala Leu Ile Gly Ala Ala Ala
515 520 525
Phe Leu Gly Gly Val Val Arg Met Thr Ile Ser Leu Thr Val Ile Leu
530 535 540
Ile Glu Ser Thr Asn Glu Ile Thr Tyr Gly Leu Pro Ile Met Val Thr
545 550 555 560
Leu Met Val Ala Lys Trp Thr Gly Asp Phe Phe Asn Lys Gly Ile Tyr
565 570 575
Asp Ile His Val Gly Leu Arg Gly Val Pro Leu Leu Glu Trp Glu Thr
580 585 590
Glu Val Glu Met Asp Lys Leu Arg Ala Ser Asp Ile Met Glu Pro Asn
595 600 605
Leu Thr Tyr Val Tyr Pro His Thr Arg Ile Gln Ser Leu Val Ser Ile
610 615 620
Leu Arg Thr Thr Val His His Ala Phe Pro Val Val Thr Glu Asn Arg
625 630 635 640
Gly Asn Glu Lys Glu Phe Met Lys Gly Asn Gln Leu Ile Ser Asn Asn
645 650 655
Ile Lys Phe Lys Lys Ser Ser Ile Leu Thr Arg Ala Gly Glu Gln Arg
660 665 670
Lys Arg Ser Gln Ser Met Lys Ser Tyr Pro Ser Ser Glu Leu Arg Asn
675 680 685
Met Cys Asp Glu His Ile Ala Ser Glu Glu Pro Ala Glu Lys Glu Asp
690 695 700
Leu Leu Gln Gln Met Leu Glu Arg Arg Tyr Thr Pro Tyr Pro Asn Leu
705 710 715 720
Tyr Pro Asp Gln Ser Pro Ser Glu Asp Trp Thr Met Glu Glu Arg Phe
725 730 735
Arg Pro Leu Thr Phe His Gly Leu Ile Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr
740 745 750
Leu Leu Val Arg Gly Val Cys Tyr Ser Glu Ser Gln Ser Ser Ala Ser
755 760 765
Gln Pro Arg Leu Ser Tyr Ala Glu Met Ala Glu Asp Tyr Pro Arg Tyr
770 775 780
Pro Asp Ile His Asp Leu Asp Leu Thr Leu Leu Asn Pro Arg Met Ile
785 790 795 800
Val Asp Val Thr Pro Tyr Met Asn Pro Ser Pro Phe Thr Val Ser Pro
805 810 815
Asn Thr His Val Ser Gln Val Phe Asn Leu Phe Arg Thr Met Gly Leu
820 825 830
Arg His Leu Pro Val Val Asn Ala Val Gly Glu Ile Val Gly Ile Ile
835 840 845
Thr Arg His Asn Leu Thr Tyr Glu Phe Leu Gln Ala Arg Leu Arg Gln
850 855 860
His Tyr Gln Thr Ile
865

<210> 11
<211> 2750
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (69)..(2480)
<223> C1C-7

<300>
<308> GenBank/Z67744 GI:1177612

<400> 11

ggggcgccgg tcacgggaac gctgccggc tgccggctgt tcttgtggag tttggtcctc 60
agtggggcc atg gcc aac gtt tct aag aaa gtg tct tgg tcc ggc cga gat 110
Met Ala Asn Val Ser Lys Lys Val Ser Trp Ser Gly Arg Asp
1 5 10

cgc gat gac gag gag ggg gcg ccg ctg ctt cga agg acg ggg caa cct 158
Arg Asp Asp Glu Glu Gly Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Gly Gln Pro
15 20 25 30

gac gag gag acg ccg ctg ctg aac gga gcc ggg ccg ggc gcg cgc cag 206
Asp Glu Glu Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Arg Gln
35 40 45

tct cat tct gca ctt ttc cga att gga cag atg aac aac gtg gag ctg 254
Ser His Ser Ala Leu Phe Arg Ile Gly Gln Met Asn Asn Val Glu Leu
50 55 60

gat gat gaa ctc ctg gac ccg gaa gtg gac cct cct cac acc ttc ccc 302
Asp Asp Glu Leu Leu Asp Pro Glu Val Asp Pro Pro His Thr Phe Pro
65 70 75

aag gag att cca cac aac gag aag ctc ctc tcc ctc aag tat gag agc 350
Lys Glu Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser
80 85 90

ctg gac tat gac aat agt gag aat cag ctc ttc ctg gag gag gaa aga 398
Leu Asp Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg
95 100 105 110

cga atc aac cac acg gct ttc cgg aca gtg gag atc aag cgc tgg gtt 446
Arg Ile Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val
115 120 125

atc tgt gcc ctc att gga atc ctc aca ggc cta gta gcc tgc ttc att 494
Ile Cys Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile
130 135 140

gac att gta gtg gag aac ctg gca ggc ctc aag tac cga gtc atc aag 542
Asp Ile Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys
145 150 155

gac aac atc gac aag ttc aca gag aag ggc ggc ctg tcc ttc tcc ctc 590
Asp Asn Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Leu Ser Phe Ser Leu
160 165 170

ctg ctg tgg gcc aca ctg aac tct gcc ttc gtg ctc gtg ggg tct gtg 638
Leu Leu Trp Ala Thr Leu Asn Ser Ala Phe Val Leu Val Gly Ser Val
175 180 185 190

att gtg gcc ttc ata gag cca gtt gct gct ggc agc gga atc cct cag 686
Ile Val Ala Phe Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Gln
195 200 205

atc aag tgc ttc ctc aat ggg gtg aag atc ccc cac gtg gtg cgg ctc 734

Ile Lys Cys Phe Leu Asn Gly Val Lys Ile Pro His Val Val Val Arg Leu	210	215	220		
aag acg ctg gtg atc aag gtg tct ggc gtg att ctg tct gtg gta ggg Lys Thr Leu Val Ile Lys Val Ser Gly Val Ile Leu Ser Val Val Gly	225	230	235	782	
gga ctg gct gtg gga aag gaa ggg cca atg atc cac tca gga tcc gtg Gly Leu Ala Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser Val	240	245	250	830	
att gct gca ggg att tca cag gga agg tcg acg tca ctc aag cga gat Ile Ala Ala Gly Ile Ser Gln Gly Arg Ser Thr Ser Leu Lys Arg Asp	255	260	265	270	878
ttt aag atc ttt gaa tat ttc cgc aga gat aca gag aag cgg gat ttt Phe Lys Ile Phe Glu Tyr Phe Arg Arg Asp Thr Glu Lys Arg Asp Phe	275	280	285	926	
gtc tca gct gga gct gca gct gga gtg tct gct gcg ttt gga gca cct Val Ser Ala Gly Ala Ala Gly Val Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro	290	295	300	974	
gtg ggt ggg gtc ctg ttc agc ctg gaa gag ggc gcc tcc ttc tgg aat Val Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Gly Ala Ser Phe Trp Asn	305	310	315	1022	
cag ttc ctg aca tgg aga att ttc ttt gct tcc atg att tcg acc ttt Gln Phe Leu Thr Trp Arg Ile Phe Ala Ser Met Ile Ser Thr Phe	320	325	330	1070	
aca ctg aat ttt gtt ctg agc atc tac cat gga aac atg tgg gac ctg Thr Leu Asn Phe Val Leu Ser Ile Tyr His Gly Asn Met Trp Asp Leu	335	340	345	350	1118
tcc agc cct ggc ctc ata aat ttt gga aga ttc gac tca gag aaa atg Ser Ser Pro Gly Leu Ile Asn Phe Gly Arg Phe Asp Ser Glu Lys Met	355	360	365	1166	
gcc tac aca atc cat gag att cct gtc ttc atc gcc atg ggt gtg gtg Ala Tyr Thr Ile His Glu Ile Pro Val Phe Ile Ala Met Gly Val Val	370	375	380	1214	
ggt ggc att ctt gga gcc gtg ttc aat gcc ttg aat tac tgg cta act Gly Gly Ile Leu Gly Ala Val Phe Asn Ala Leu Asn Tyr Trp Leu Thr	385	390	395	1262	
atg ttt cga atc agg tac atc cac cgg ccc tgc ctc caa gtg att gag Met Phe Arg Ile Arg Tyr Ile His Arg Pro Cys Leu Gln Val Ile Glu	400	405	410	1310	
gcc atg ctg gtg gca gct gtc aca gcc aca gtt gca ttt gtc ttg att Ala Met Leu Val Ala Ala Val Thr Ala Thr Val Ala Phe Val Leu Ile	415	420	425	430	1358
tac tcg tct cga gat tgc cag ccc ctg cag ggg agc tcc atg tcc tac Tyr Ser Ser Arg Asp Cys Gln Pro Leu Gln Gly Ser Ser Met Ser Tyr	435	440	445	1406	
cca ctc cag ctc ttc tgt gca gat ggc gaa tac aac tca atg gcc gca Pro Leu Gln Leu Phe Cys Ala Asp Gly Glu Tyr Asn Ser Met Ala Ala	450	455	460	1454	
gcc ttc ttt aac acc cct gag aag agc gtc gtc agc ctg ttc cac gac Ala Phe Phe Asn Thr Pro Glu Lys Ser Val Val Ser Leu Phe His Asp	465	470	475	1502	
cca cca ggc tcc tat aat ccc atg act ctc ggc ctg ttc acc ctg gtc				1550	

Pro Pro Gly Ser Tyr Asn Pro Met Thr Leu Gly Leu Phe Thr Leu Val			
480	485	490	
tac ttc ttc ctg gcc tgc tgg acc tat ggc ctc aca gta tct gct ggt			1598
Tyr Phe Phe Leu Ala Cys Trp Thr Tyr Gly Leu Thr Val Ser Ala Gly			
495	500	505	510
gtc ttc atc cca tcc ctg ctc att ggg gct gcc tgg ggc cga ctc ttt			1646
Val Phe Ile Pro Ser Leu Leu Ile Gly Ala Ala Trp Gly Arg Leu Phe			
515	520	525	
ggc atc tcc atg tcc tac ctc aca gga gca gcg atc tgg gca gat ccg			1694
Gly Ile Ser Met Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Ala Ile Trp Ala Asp Pro			
530	535	540	
ggt aaa tac gcc ctg atg gga gct gct cag ctt ggt ggg atc gtg			1742
Gly Lys Tyr Ala Leu Met Gly Ala Ala Gln Leu Gly Gly Ile Val			
545	550	555	
agg atg acc ctt agc ctg aca gtc atc atg atg gag gcc acc agc aac			1790
Arg Met Thr Leu Ser Leu Thr Val Ile Met Met Glu Ala Thr Ser Asn			
560	565	570	
gtg acc tac ggt ttt ccc atc atg ttg gtg ctg atg act gcc aag att			1838
Val Thr Tyr Gly Phe Pro Ile Met Leu Val Leu Met Thr Ala Lys Ile			
575	580	585	590
gtg ggt gat gtc ttc att gag ggc ctc tat gac atg cac atc cag ctg			1886
Val Gly Asp Val Phe Ile Glu Gly Leu Tyr Asp Met His Ile Gln Leu			
595	600	605	
caa agt gtg ccc ttc cta cac tgg gaa gcc ccg gtc acc tca cat tcg			1934
Gln Ser Val Pro Phe Leu His Trp Glu Ala Pro Val Thr Ser His Ser			
610	615	620	
ctc act gcc agg gaa gta atg agc acg cct gtg acc tgc ctg agg agg			1982
Leu Thr Ala Arg Glu Val Met Ser Thr Pro Val Thr Cys Leu Arg Arg			
625	630	635	
aga gag aag gtt ggc atc atc gtg gat gtc cta agt gac aca gcg tct			2030
Arg Glu Lys Val Gly Ile Ile Val Asp Val Leu Ser Asp Thr Ala Ser			
640	645	650	
aat cac aat ggg ttc cct gtg gtg gag gat gta gga gac acc cag cca			2078
Asn His Asn Gly Phe Pro Val Val Glu Asp Val Gly Asp Thr Gln Pro			
655	660	665	670
gcc aga ctc caa ggc cta atc ctg cgt tcc cag ctc atc gtg ctc ctg			2126
Ala Arg Leu Gln Gly Leu Ile Leu Arg Ser Gln Leu Ile Val Leu Leu			
675	680	685	
aag cac aag gtg ttt gtg gag agg tcc aac atg ggt ttg gtg cag cgg			2174
Lys His Lys Val Phe Val Glu Arg Ser Asn Met Gly Leu Val Gln Arg			
690	695	700	
aga ctg agg ctg aaa gac ttt cgc gat gcc tac cca cgc ttc ccc cca			2222
Arg Leu Arg Leu Lys Asp Phe Arg Asp Ala Tyr Pro Arg Phe Pro Pro			
705	710	715	
atc cag tcc atc cac gta tcc cag gat gag cgg gag tgc acc atg gac			2270
Ile Gln Ser Ile His Val Ser Gln Asp Glu Arg Glu Cys Thr Met Asp			
720	725	730	
ctt tct gag ttc atg aac cct tct ccc tac act gtg cca cag gag gca			2318
Leu Ser Glu Phe Met Asn Pro Ser Pro Tyr Thr Val Pro Gln Glu Ala			
735	740	745	750
tct ctt cct cga gtg ttc aag ctg ttc cgg gct ctg ggc ctg agg cac			2366

Ser Leu Pro Arg Val Phe Lys Leu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Arg His
755 760 765

ctg gtc gta gta gac aac cac aat cag gtg gtc ggg ctg gtg acc agg 2414
Leu Val Val Val Asp Asn His Asn Gln Val Val Gly Leu Val Thr Arg
770 775 780

aag gac cta gca aga tac cgc cta gga aaa gga ggc cta gaa gag ctt 2462
Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Arg Leu Gly Lys Gly Glu Glu Leu
785 790 795

tca ctg gcc cag acg tga gggctggccc ccacccttgg gcagcggcac 2510
Ser Leu Ala Gln Thr
800

cccgccccct ctgcacccctcc tcccagggtc cctggctctca gccaaagcct tgccctggc 2570
agtgcagcaa caggagcaa tgccctcccc gggcttggt ggtgtggggc ccagaccctt 2630
tgtcctgggc agttggttt catcatcagc atttccctat tccctgaacc tgcatgcctc 2690
agacttgtcc cactcctggg tcccttctcc caggatgtaa agtgtgtttt cacacccctt 2750

<210> 12
<211> 803
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 12
Met Ala Asn Val Ser Lys Lys Val Ser Trp Ser Gly Arg Asp Arg Asp
1 5 10 15
Asp Glu Glu Gly Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Gly Gln Pro Asp Glu
20 25 30
Glu Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Arg Gln Ser His
35 40 45
Ser Ala Leu Phe Arg Ile Gly Gln Met Asn Asn Val Glu Leu Asp Asp
50 55 60
Glu Leu Leu Asp Pro Glu Val Asp Pro Pro His Thr Phe Pro Lys Glu
65 70 75 80
Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser Leu Asp
85 90 95
Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Arg Arg Ile
100 105 110
Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val Ile Cys
115 120 125
Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile Asp Ile
130 135 140
Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys Asp Asn
145 150 155 160
Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu Leu
165 170 175
Trp Ala Thr Leu Asn Ser Ala Phe Val Leu Val Gly Ser Val Ile Val
180 185 190
Ala Phe Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Gln Ile Lys
195 200 205
Cys Phe Leu Asn Gly Val Lys Ile Pro His Val Val Arg Leu Lys Thr
210 215 220
Leu Val Ile Lys Val Ser Gly Val Ile Leu Ser Val Val Gly Gly Leu
225 230 235 240
Ala Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser Val Ile Ala
245 250 255
Ala Gly Ile Ser Gln Gly Arg Ser Thr Ser Leu Lys Arg Asp Phe Lys
260 265 270
Ile Phe Glu Tyr Phe Arg Arg Asp Thr Glu Lys Arg Asp Phe Val Ser
275 280 285
Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro Val Gly
290 295 300

Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Gly Ala Ser Phe Trp Asn Gln Phe
305 310 315 320
Leu Thr Trp Arg Ile Phe Phe Ala Ser Met Ile Ser Thr Phe Thr Leu
325 330 335
Asn Phe Val Leu Ser Ile Tyr His Gly Asn Met Trp Asp Leu Ser Ser
340 345 350
Pro Gly Leu Ile Asn Phe Gly Arg Phe Asp Ser Glu Lys Met Ala Tyr
355 360 365
Thr Ile His Glu Ile Pro Val Phe Ile Ala Met Gly Val Val Gly Gly
370 375 380
Ile Leu Gly Ala Val Phe Asn Ala Leu Asn Tyr Trp Leu Thr Met Phe
385 390 395 400
Arg Ile Arg Tyr Ile His Arg Pro Cys Leu Gln Val Ile Glu Ala Met
405 410 415
Leu Val Ala Ala Val Thr Ala Thr Val Ala Phe Val Leu Ile Tyr Ser
420 425 430
Ser Arg Asp Cys Gln Pro Leu Gln Gly Ser Ser Met Ser Tyr Pro Leu
435 440 445
Gln Leu Phe Cys Ala Asp Gly Glu Tyr Asn Ser Met Ala Ala Ala Phe
450 455 460
Phe Asn Thr Pro Glu Lys Ser Val Val Ser Leu Phe His Asp Pro Pro
465 470 475 480
Gly Ser Tyr Asn Pro Met Thr Leu Gly Leu Phe Thr Leu Val Tyr Phe
485 490 495
Phe Leu Ala Cys Trp Thr Tyr Gly Leu Thr Val Ser Ala Gly Val Phe
500 505 510
Ile Pro Ser Leu Leu Ile Gly Ala Ala Trp Gly Arg Leu Phe Gly Ile
515 520 525
Ser Met Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Ala Ile Trp Ala Asp Pro Gly Lys
530 535 540
Tyr Ala Leu Met Gly Ala Ala Ala Gln Leu Gly Gly Ile Val Arg Met
545 550 555 560
Thr Leu Ser Leu Thr Val Ile Met Met Glu Ala Thr Ser Asn Val Thr
565 570 575
Tyr Gly Phe Pro Ile Met Leu Val Leu Met Thr Ala Lys Ile Val Gly
580 585 590
Asp Val Phe Ile Glu Gly Leu Tyr Asp Met His Ile Gln Leu Gln Ser
595 600 605
Val Pro Phe Leu His Trp Glu Ala Pro Val Thr Ser His Ser Leu Thr
610 615 620
Ala Arg Glu Val Met Ser Thr Pro Val Thr Cys Leu Arg Arg Arg Glu
625 630 635 640
Lys Val Gly Ile Ile Val Asp Val Leu Ser Asp Thr Ala Ser Asn His
645 650 655
Asn Gly Phe Pro Val Val Glu Asp Val Gly Asp Thr Gln Pro Ala Arg
660 665 670
Leu Gln Gly Leu Ile Leu Arg Ser Gln Leu Ile Val Leu Leu Lys His
675 680 685
Lys Val Phe Val Glu Arg Ser Asn Met Gly Leu Val Gln Arg Arg Leu
690 695 700
Arg Leu Lys Asp Phe Arg Asp Ala Tyr Pro Arg Phe Pro Pro Ile Gln
705 710 715 720
Ser Ile His Val Ser Gln Asp Glu Arg Glu Cys Thr Met Asp Leu Ser
725 730 735
Glu Phe Met Asn Pro Ser Pro Tyr Thr Val Pro Gln Glu Ala Ser Leu
740 745 750
Pro Arg Val Phe Lys Leu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Arg His Leu Val
755 760 765
Val Val Asp Asn His Asn Gln Val Val Gly Leu Val Thr Arg Lys Asp
770 775 780
Leu Ala Arg Tyr Arg Leu Gly Lys Gly Gly Leu Glu Glu Leu Ser Leu
785 790 795 800
Ala Gln Thr

<210> 13
<211> 2393
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2370)
<223> ClC-7

<300>
<303> FEBS Lett.
<304> 1995
<305> 377 (1)
<306> 15-20
<308> GenBank/Z67743 GI:1177439

<400> 13

gac gag gag gcg gcg ccg ctg ctg cgg agg acg gcg cgg ccc ggc ggg 48
Asp Glu Glu Ala Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Ala Arg Pro Gly Gly
1 5 10 15

ggg acg ccg ctg ctg aac ggg gct ggg ccc ggg gct gcg cgc cag tca 96
Gly Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Ala Arg Gln Ser
20 25 30

cca cgt tct gcg ctt ttc cga gtc gga cat atg agc agc gtg gag ctg 144
Pro Arg Ser Ala Leu Phe Arg Val Gly His Met Ser Ser Val Glu Leu
35 40 45

gat gat gaa ctt ttg gac ccg gat atg gac cct cca cat ccc ttc ccc 192
Asp Asp Glu Leu Leu Asp Pro Asp Met Asp Pro Pro His Pro Phe Pro
50 55 60

aag gag atc cca cac aac gag aag ctc ctg tcc ctc aag tat gag agc 240
Lys Glu Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser
65 70 75 80

ttg gac tat gac aac agt gag aac cag ctg ttc ctg gag gag gag cg 288
Leu Asp Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg
85 90 95

cgg atc aat cac acg gcc ttc cgg acg gtg gag atc aag cgc tgg gtc 336
Arg Ile Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val
100 105 110

atc tgc gcc ctc att ggg atc ctc acg ggc ctc gtg gcc tgc ttc att 384
Ile Cys Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile
115 120 125

gac atc gtg gtg gaa aac ctg gct ggc ctc aag tac agg gtc atc aag 432
Asp Ile Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys
130 135 140

ggc aat atc gac aag ttc aca gag aag ggc gga ctg tcc ttc tcc ctg 480
Gly Asn Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu
145 150 155 160

ttg ctg tgg gcc acg ctg aac gcc gcc ttc gtg ctc gtg ggc tct gtg 528

Leu	Leu	Trp	Ala	Thr	Leu	Asn	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Val			
																165		
																170		
																175		
att	gtg	gct	ttc	ata	gag	ccg	gtg	gct	ggc	agc	gga	atc	ccc	cag		576		
Ile	Val	Ala	Phe	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Gln			
																180		
																185		
																190		
atc	aag	tgc	ttc	ctc	aac	ggg	gtg	aag	atc	ccc	cac	gtg	gtg	cg	ctc		624	
Ile	Lys	Cys	Phe	Leu	Asn	Gly	Val	Lys	Ile	Pro	His	Val	Val	Arg	Leu			
																195		
																200		
																205		
aag	acg	ttg	gtg	atc	aaa	gtg	tcc	ggt	gtg	atc	ctg	tcc	gtg	gtc	ggg		672	
Lys	Thr	Leu	Val	Ile	Lys	Val	Ser	Gly	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Val	Gly			
																210		
																215		
																220		
ggc	ctg	gcc	gtg	gga	aag	gaa	ggg	ccg	atg	atc	cac	tca	ggt	tca	gtg		720	
Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Lys	Glu	Gly	Pro	Met	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Val			
																225		
																230		
																235		
																240		
att	gcc	gcc	ggg	atc	tct	cag	gga	agg	tca	agc	tca	ctg	aaa	cga	gat		768	
Ile	Ala	Ala	Gly	Ile	Ser	Gln	Gly	Arg	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Arg	Asp			
																245		
																250		
																255		
ttc	aag	atc	ttc	gag	tac	ctc	cg	aga	gac	aca	gag	aag	cg	gac	ttc		816	
Phe	Lys	Ile	Phe	Glu	Tyr	Leu	Arg	Arg	Asp	Thr	Glu	Lys	Arg	Asp	Phe			
																260		
																265		
																270		
gtc	tcc	gca	ggg	gct	g	g	g	cc	gg	tc	g	g	ttt	gg	cc		864	
Val	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gly	Ala	Pro			
																275		
																280		
																285		
gt	ggt	ggg	gtc	ctg	ttc	agc	ttg	gag	gag	ggt	g	tc	ttc	tgg	aa		912	
Val	Gly	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Ala	Ser	Phe	Trp	Asn			
																290		
																295		
																300		
cag	t	tc	tg	acc	tgg	agg	atc	ttc	ttt	gct	tcc	atg	atc	tcc	acg	ttc		960
Gln	Phe	Leu	Thr	Trp	Arg	Ile	Phe	Phe	Ala	Ser	Met	Ile	Ser	Thr	Phe			
																305		
																310		
																315		
acc	ctg	aat	ttt	gtt	ctg	agc	att	tac	cac	ggg	aac	atg	tgg	gac	ctg		1008	
Thr	Leu	Asn	Phe	Val	Leu	Ser	Ile	Tyr	H ₅	Gly	Asn	Met	Trp	Asp	Leu			
																325		
																330		
																335		
tcc	agc	cca	ggc	ctc	atc	aa	tcc	gga	agg	ttt	gac	tc	g	g	aaa	atg		1056
Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Asn	Phe	Gly	Arg	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys	Met			
																340		
																345		
																350		
gcc	tac	acg	atc	cac	gag	atc	ccg	gtc	ttc	atc	gcc	atg	ggc	gt	gt		1104	
Ala	Tyr	Thr	Ile	His	Glu	Ile	Pro	Val	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Val	Val			
																355		
																360		
																365		
ggc	ggt	gt	tt	gg	ca	gt	tt	at	gg	tt	g	tc	g	gg	cc		1152	
Gly	Gly	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Phe	Asn	Ala	Leu	Asn	Tyr	Trp	Leu	Thr			
																370		
																375		
																380		
'atg	ttt	cga	atc	agg	tac	atc	cac	cg	ccc	tgc	ctg	cag	gt	tg	att	gag		1200
Met	Phe	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ile	His	Arg	Pro	Cys	Leu	Gln	Val	Ile	Glu			
																385		
																390		
																395		
																400		
gcc	gt	ctg	gt	gg	cc	gt	cc	ac	gt	tt	gc	tc	gt	ct	atc		1248	
Ala	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Th	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Ile			
																405		
																410		
																415		
tac	tcg	tcg	cg	gat	tgc	cag	ccc	ctg	cag	ggg	ggc	tcc	atg	tcc	tac		1296	
Tyr	Ser	Ser	Arg	Asp	Cys	Gln	Pro	Leu	Gln	Gly	Gly	Ser	Met	Ser	Tyr			
																420		
																425		
																430		
ccg	ctg	cag	ctc	ttt	tgt	gca	gat	ggc	gag	tac	aac	tcc	atg	gct	g		1344	

Pro Leu Gln Leu Phe Cys Ala Asp Gly Glu Tyr Asn Ser Met Ala Ala	435	440	445	
Ala Phe Phe Asn Thr Pro Glu Lys Ser Val Val Ser Leu Phe His Asp	450	455	460	1392
ccg ttc ttc aac acc ccg gag aag agc gtg gtg agc ctc ttc cac gac				
Pro Pro Gly Ser Tyr Asn Pro Leu Thr Leu Gly Leu Phe Thr Leu Val	465	470	475	1440
tac ttc ttc ctg gcc tgc tgg acc tac ggg ctc acg gtg tct gcc ggg	485	490	495	1488
Tyr Phe Leu Ala Cys Trp Thr Tyr Gly Leu Thr Val Ser Ala Gly				
gtc ttc atc ccg tcc ctg ctc atc ggg gct gcc tgg ggc cgg ctc ttt	500	505	510	1536
Val Phe Ile Pro Ser Leu Leu Ile Gly Ala Ala Trp Gly Arg Leu Phe				
ggg atc tcc ctg tcc tac ctc acg ggg gcg gcg atc tgg gcg gac ccc	515	520	525	1584
Gly Ile Ser Leu Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Ala Gln Leu Gly Gly Ile Val	530	535	540	1632
cgg atg aca ctg agc ctg acc gtc atc atg atg gag gcc acc agc aac	545	550	555	1680
Arg Met Thr Leu Ser Leu Thr Val Ile Met Met Glu Ala Thr Ser Asn				
gtg acc tac ggc ttc ccc atc atg ctg gtg ctc atg acc gcc aag atc	565	570	575	1728
Val Thr Tyr Gly Phe Pro Ile Met Leu Val Leu Met Thr Ala Lys Ile				
gtg ggc gac gtc ttc att gag ggc ctg tac gac atg cac att cag ctg	580	585	590	1776
Val Gly Asp Val Phe Ile Glu Gly Leu Tyr Asp Met His Ile Gln Leu				
cag agt gtg ccc ttc ctg cac tgg gag gcc ccg gtc acc tca cac tca	595	600	605	1824
Gln Ser Val Pro Phe Leu His Trp Glu Ala Pro Val Thr Ser His Ser				
ctc act gcc agg gag gtg atg agc aca cca gtg acc tgc ctg agg cgg	610	615	620	1872
Leu Thr Ala Arg Glu Val Met Ser Thr Pro Val Thr Cys Leu Arg Arg				
cgt gag aag gtc ggc gtc att gtg gac gtg ctg agc gac acg gcg tcc	625	630	635	1920
Arg Glu Lys Val Gly Val Ile Val Asp Val Leu Ser Asp Thr Ala Ser				
aat cac aac ggc ttc ccc gtg gtg gag cat gcc gat gac acc cag cct	645	650	655	1968
Asn His Asn Gly Phe Pro Val Val Glu His Ala Asp Asp Thr Gln Pro				
gcc cgg ctc cag ggc ctg atc ctg cgc tcc cag ctc atc gtt ctc cta	660	665	670	2016
Ala Arg Leu Gln Gly Leu Ile Leu Arg Ser Gln Leu Ile Val Leu Leu				
aag cac aag gtg ttt gtg gag cgg tcc aac ctg ggc ctg gta cag cgg	675	680	685	2064
Lys His Lys Val Phe Val Glu Arg Ser Asn Leu Gly Leu Val Gln Arg				
cgc ctg agg ctg aag gac ttc cga gac gcc tac ccg cgc ttc cca ccc	690	695	700	2112
Arg Leu Arg Leu Lys Asp Phe Arg Asp Ala Tyr Pro Arg Phe Pro Pro				
atc cag tcc atc cac gtg tcc cag gac gag cgg gag tgc acc atg gac				2160

Ile Gln Ser Ile His Val Ser Gln Asp Glu Arg Glu Cys Thr Met Asp 705 710 715 720	
ctc tcc gag ttc atg aac ccc tcc ccc tac acg gtg ccc cag gag gcg Leu Ser Glu Phe Met Asn Pro Ser Pro Tyr Thr Val Pro Gln Glu Ala 725 730 735	2208
tcg ctc cca cgg gtg ttc aag ctg ttc cgg gcc ctg ggc ctg cgg cac Ser Leu Pro Arg Val Phe Lys Leu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Arg His 740 745 750	2256
ctg gtg gtg gac aac cgc aat cag gtt gtc ggg ttg gtg acc agg Leu Val Val Asp Asn Arg Asn Gln Val Val Gly Leu Val Thr Arg 755 760 765	2304
aag gac ctc gcc agg tac cgc ctg gga aag aga ggc ttg gag gag ctc Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Arg Leu Gly Lys Arg Gly Leu Glu Glu Leu 770 775 780	2352
tcg ctg gcc cag acg tga ggcccagccc tgcccataat ggg Ser Leu Ala Gln Thr 785 790	2393
  <210> 14 <211> 789 <212> PRT <213> Homo sapiens	
  <400> 14 Asp Glu Glu Ala Ala Pro Leu Leu Arg Arg Thr Ala Arg Pro Gly Gly 1 5 10 15 Gly Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ala Gly Pro Gly Ala Ala Arg Gln Ser 20 25 30 Pro Arg Ser Ala Leu Phe Arg Val Gly His Met Ser Ser Val Glu Leu 35 40 45 Asp Asp Glu Leu Leu Asp Pro Asp Met Asp Pro Pro His Pro Phe Pro 50 55 60 Lys Glu Ile Pro His Asn Glu Lys Leu Leu Ser Leu Lys Tyr Glu Ser 65 70 75 80 Leu Asp Tyr Asp Asn Ser Glu Asn Gln Leu Phe Leu Glu Glu Glu Arg 85 90 95 Arg Ile Asn His Thr Ala Phe Arg Thr Val Glu Ile Lys Arg Trp Val 100 105 110 Ile Cys Ala Leu Ile Gly Ile Leu Thr Gly Leu Val Ala Cys Phe Ile 115 120 125 Asp Ile Val Val Glu Asn Leu Ala Gly Leu Lys Tyr Arg Val Ile Lys 130 135 140 Gly Asn Ile Asp Lys Phe Thr Glu Lys Gly Gly Leu Ser Phe Ser Leu 145 150 155 160 Leu Leu Trp Ala Thr Leu Asn Ala Ala Phe Val Leu Val Gly Ser Val 165 170 175 Ile Val Ala Phe Ile Glu Pro Val Ala Ala Gly Ser Gly Ile Pro Gln 180 185 190 Ile Lys Cys Phe Leu Asn Gly Val Lys Ile Pro His Val Val Arg Leu 195 200 205 Lys Thr Leu Val Ile Lys Val Ser Gly Val Ile Leu Ser Val Val Gly 210 215 220 Gly Leu Ala Val Gly Lys Glu Gly Pro Met Ile His Ser Gly Ser Val 225 230 235 240 Ile Ala Ala Gly Ile Ser Gln Gly Arg Ser Ser Ser Leu Lys Arg Asp 245 250 255 Phe Lys Ile Phe Glu Tyr Leu Arg Arg Asp Thr Glu Lys Arg Asp Phe 260 265 270 Val Ser Ala Gly Ala Ala Ala Gly Val Ser Ala Ala Phe Gly Ala Pro 275 280 285 Val Gly Gly Val Leu Phe Ser Leu Glu Glu Gly Ala Ser Phe Trp Asn 290 295 300	

Gln Phe Leu Thr Trp Arg Ile Phe Phe Ala Ser Met Ile Ser Thr Phe
305 310 315 320
Thr Leu Asn Phe Val Leu Ser Ile Tyr His Gly Asn Met Trp Asp Leu
325 330 335
Ser Ser Pro Gly Leu Ile Asn Phe Gly Arg Phe Asp Ser Glu Lys Met
340 345 350
Ala Tyr Thr Ile His Glu Ile Pro Val Phe Ile Ala Met Gly Val Val
355 360 365
Gly Gly Val Leu Gly Ala Val Phe Asn Ala Leu Asn Tyr Trp Leu Thr
370 375 380
Met Phe Arg Ile Arg Tyr Ile His Arg Pro Cys Leu Gln Val Ile Glu
385 390 395 400
Ala Val Leu Val Ala Ala Val Thr Ala Thr Val Ala Phe Val Leu Ile
405 410 415
Tyr Ser Ser Arg Asp Cys Gln Pro Leu Gln Gly Gly Ser Met Ser Tyr
420 425 430
Pro Leu Gln Leu Phe Cys Ala Asp Gly Glu Tyr Asn Ser Met Ala Ala
435 440 445
Ala Phe Phe Asn Thr Pro Glu Lys Ser Val Val Ser Leu Phe His Asp
450 455 460
Pro Pro Gly Ser Tyr Asn Pro Leu Thr Leu Gly Leu Phe Thr Leu Val
465 470 475 480
Tyr Phe Phe Leu Ala Cys Trp Thr Tyr Gly Leu Thr Val Ser Ala Gly
485 490 495
Val Phe Ile Pro Ser Leu Leu Ile Gly Ala Ala Trp Gly Arg Leu Phe
500 505 510
Gly Ile Ser Leu Ser Tyr Leu Thr Gly Ala Ala Ile Trp Ala Asp Pro
515 520 525
Gly Lys Tyr Ala Leu Met Gly Ala Ala Ala Gln Leu Gly Gly Ile Val
530 535 540
Arg Met Thr Leu Ser Leu Thr Val Ile Met Met Glu Ala Thr Ser Asn
545 550 555 560
Val Thr Tyr Gly Phe Pro Ile Met Leu Val Leu Met Thr Ala Lys Ile
565 570 575
Val Gly Asp Val Phe Ile Glu Gly Leu Tyr Asp Met His Ile Gln Leu
580 585 590
Gln Ser Val Pro Phe Leu His Trp Glu Ala Pro Val Thr Ser His Ser
595 600 605
Leu Thr Ala Arg Glu Val Met Ser Thr Pro Val Thr Cys Leu Arg Arg
610 615 620
Arg Glu Lys Val Gly Val Ile Val Asp Val Leu Ser Asp Thr Ala Ser
625 630 635 640
Asn His Asn Gly Phe Pro Val Val Glu His Ala Asp Asp Thr Gln Pro
645 650 655
Ala Arg Leu Gln Gly Leu Ile Leu Arg Ser Gln Leu Ile Val Leu Leu
660 665 670
Lys His Lys Val Phe Val Glu Arg Ser Asn Leu Gly Leu Val Gln Arg
675 680 685
Arg Leu Arg Leu Lys Asp Phe Arg Asp Ala Tyr Pro Arg Phe Pro Pro
690 695 700
Ile Gln Ser Ile His Val Ser Gln Asp Glu Arg Glu Cys Thr Met Asp
705 710 715 720
Leu Ser Glu Phe Met Asn Pro Ser Pro Tyr Thr Val Pro Gln Glu Ala
725 730 735
Ser Leu Pro Arg Val Phe Lys Leu Phe Arg Ala Leu Gly Leu Arg His
740 745 750
Leu Val Val Val Asp Asn Arg Asn Gln Val Val Gly Leu Val Thr Arg
755 760 765
Lys Asp Leu Ala Arg Tyr Arg Leu Gly Lys Arg Gly Leu Glu Glu Leu
770 775 780
Ser Leu Ala Gln Thr
785

Referenzen:

- (1) Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC (1992) Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* 257:1125-1128.
- (2) Dorin JR, Dickinson P, Alton EW, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, et al (1992) Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature* 359:211-215
- (3) Ratcliff R, Evans MJ, Doran J, Wainwright BJ, Williamson R, Colledge WH (1992) Disruption of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in embryonic stem cells by gene targeting. *Transgenic Res.* 1:177-181.
- (4) Ratcliff R, Evans MJ, Cuthbert AW, MacVinish LJ, Foster D, Anderson JR, Colledge WH (1993) Production of a severe cystic fibrosis mutation in mice by gene targeting. *Nature Genet.* 4:35-41.
- (5) Matsumura Y, Uchida S, Kondo Y, Miyazaki H, Ko SB, Hayama A, Morimoto T, Liu W, Arisawa M, Sasaki S, Marumo F (1999) Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nature Genet.* 21:95-98.
- (6) Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW (2000) Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407:870-876.
- (7) Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litzi TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Argani P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000) Targeted disruption of the kvlqt1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106:1447-1455.
- (8) Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ (2000) CIC-5 Cl⁻ -channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-373.
- (9) Steinmeyer K, Lorenz C, Pusch M, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Multimeric structure of ClC-1 chloride channel revealed by mutations in dominant myotonia congenita (Thomsen). *EMBO J* 13:737-743.
- (10) Gronemeier M, Condie A, Prosser J, Steinmeyer K, Jentsch TJ, Jockusch H (1994) Nonsense and missense mutations in the muscular chloride channel gene Clc-1 of myotonic mice. *J Biol Chem* 269:5963-5967.

- (11) Lorenz C, Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ (1994) Genomic organization of the human muscle chloride channel CIC-1 and analysis of novel mutations leading to Becker-type myotonia. *Hum Mol Genet* 3:941-946.
- (12) Meyer-Kleine C, Steinmeyer K, Ricker K, Jentsch TJ, Koch MC. (1995) Spectrum of mutations in the major human skeletal muscle chloride channel gene (CLCN1) leading to myotonia. *Am J Hum Genet.* 57:1325-1334.
- (13) Pusch M, Steinmeyer K, Koch MC, Jentsch TJ. (1995) Mutations in dominant human myotonia congenita drastically alter the voltage dependence of the CIC-1 chloride channel. *Neuron* 15:1455-1463.
- (14) Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigiden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379:445-449.
- (15) Lloyd SE, Pearce SH, Gunther W, Kawaguchi H, Igarashi T, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Idiopathic low molecular weight proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to mutations of the renal chloride channel (CLCN5). *J Clin Invest.* 99:967-974.
- (16) Lloyd SE, Gunther W, Pearce SH, Thomson A, Bianchi ML, Bosio M, Craig IW, Fisher SE, Scheinman SJ, Wrong O, Jentsch TJ, Thakker RV. (1997) Characterisation of renal chloride channel, CLCN5, mutations in hypercalciuric nephrolithiasis (kidney stones) disorders. *Hum Mol Genet* 6:1233-1239.
- (17) Schmidt-Rose T, Jentsch TJ. (1997) Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J Biol Chem* 272:20515-20521.
- (18) Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. (1998) Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Geflp. *J Biol Chem* 273:15110-15118.
- (19) Kubisch C, Schmidt-Rose T, Fontaine B, Bretag AH, Jentsch TJ. (1998) CLC-1 chloride channel mutations in myotonia congenita: variable penetrance of mutations shifting the voltage dependence. *Hum Mol Genet.* 7:1753-1760.
- (20) Igarashi T, Gunther W, Sekine T, Inatomi J, Shiraga H, Takahashi S, Suzuki J, Tsuru N, Yanagihara T, Shimazu M, Jentsch TJ, Thakker RV. (1998) Functional characterization of renal chloride channel, CLCN5, mutations

- associated with Dent's Japan disease. *Kidney Int.* 54:1850-1856.
- (21) Friedrich T, Breiderhoff T, Jentsch TJ. (1999) Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274:896-902.
- (22) Yamamoto K, Cox JP, Friedrich T, Christie PT, Bald M, Houtman PN, Lapsley MJ, Patzer L, Tsimaratos M, Van'T Hoff WG, Yamaoka K, Jentsch TJ, Thakker RV. (2000) Characterization of renal chloride channel (CLCN5) mutations in Dent's disease. *J Am Soc Nephrol* 11:1460-1468.
- (23) Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. (2000) CIC-5 Cl-channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408:369-373.
- (24) Fahlke C. (2000) Molecular mechanisms of ion conduction in ClC-type chloride channels: lessons from disease-causing mutations. *Kidney Int* 57:780-786.
- (25) Jen KY, Gewirtz AM. (2000) Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies. *Stem Cells* 18:307-319.
- (26) Marschall P, Thomson JB, Eckstein F. Inhibition of gene expression with ribozymes. *Cell Mol Neurobiol*. 14:523-538.
- (27) Lewalle P, Martiat P (1993) Inhibition of P210 expression in chronic myeloid leukaemia: oligonucleotides and/or transduced antisense sequences. *Leuk Lymphoma* 11 Suppl 1:139-43.
- (28) Montrose-Rafizadeh C, Kole J, Bartkowski LM, Lee LH, Blackmon DL, Behnken SE, Gearhart JD, Cohn JA, Montrose MH (1997). Gene targeting of a CFTR allele in HT29 human epithelial cells. *J Cell Physiol* 170:299-308
- (29) Luyckx VA, Leclercq B, Dowland LK, Yu AS (1999) Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12174-12179
- (30) Liu R, Li W, Karin NJ, Bergh JJ, Adler-Storthz K, Farach-Carson MC (2000) Ribozyme ablation demonstrates that the cardiac subtype of the voltage-sensitive calcium channel is the molecular transducer of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated calcium influx in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 275:8711-8718
- (31) Nakao M, Furukawa K, Satoh E, Ono K, Iijima T (2000) Inhibition by antisense oligonucleotides of plasma membrane Ca²⁺ ATPase in vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 387:273-277.

- (32) Tottene A, Volsen S, Pietrobon D (2000) alpha1E sub-units form the pore of three cerebellar R-type calcium channels with different pharmacological and permeation properties. *J Neurosci* 20:171-178.
- (33) Brussaard AB (1997) Antisense oligonucleotides induce functional deletion of ligand gated ion channels in cultured neurons and brain explants. *J Neurosci Methods* 71:55-64.
- (34) Vincent A, Lautermilch NJ, Spitzer NC (2000) Antisense suppression of potassium channel expression demonstrates its role in maturation of the action potential. *J Neurosci* 20:6087-6094.
- (35) Wang L, Chen L, Jacob TJ (2000) The role of ClC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by anti-sense inhibition. *J Physiol.* 524: 63-75.
- (36) Leconte L, Barnstable CJ. (2000) Impairment of rod cGMP-gated channel alpha-subunit expression leads to photoreceptor and bipolar cell degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:917-926.
- (37) Gokhan S, Song Q, Mehler MF (1998) Generation and regulation of developing immortalized neural cell lines. *Methods* 16:345-358.
- (38) Katakura Y, Alam S, Shirahata S. (1998) Immortalization by gene transfection. *Methods Cell Biol* 57:69-91.
- (39) Yeager TR, Reddel RR (1999) Constructing immortalized human cell lines. *Curr Opin Biotechnol* 10:465-469.
- (40) Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, Kioussis D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5096-5100.
- (41) Whitehead RH, VanEeden PE, Noble MD, Ataliotis P, Jat PS. (1993) Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:587-591.
- (42) D'Abaco GM, Whitehead RH, Burgess AW (1996) Synergy between Apc min and an activated ras mutation is sufficient to induce colon carcinomas. *Mol Cell Biol* 16:884-891.
- (43) Vandewalle A. (1999) Immortalized kidney cells derived from transgenic mice harboring L-type pyruvate kinase and vimentin promoters. *Exp Nephrol* 7:386-393.
- (44) Miesenbock G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-

- sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394: 192-195.
- (45) Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6803-68088.
- (46) Kneen M, Farinas J, Li Y, Verkman AS (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* 74:1591-1599.
- (47) Wu MM, Llopis J, Adams SR, McCaffery JM, Teter K, Kulomaa MS, Machen TE, Moore HP, Tsien RY. (2000) Studying organelle physiology with fusion protein-targeted avidin and fluorescent biotin conjugates. *Methods Enzymol.* 327:546-564.
- (48) Schapiro FB, Grinstein S. (2000) Determinants of the pH of the Golgi complex. *J Biol Chem* 275:21025-21032.
- (49) Demaurex N, Furuya W, D'Souza S, Bonifacino JS, Grinstein S (1998) Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J Biol Chem* 273:2044-2051.
- (50) Diwu Z, Chen CS, Zhang C, Klaubert DH, Haugland RP. (1999) A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chem Biol* 6:411-418.
- (51) Overly CC, Lee KD, Berthiaume E, Hollenbeck PJ. (1995) Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratio-metric imaging with pyranine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3156-3160.
- (52) Boyde A, Ali NN, Jones SJ. (1984) Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 156:216-220
- (53) Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, Athanasou NA. (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci.* 1984 Mar;66:383-399.
- (54) Sun L, Adebajo OA, Moonga BS, Corisdeo S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Arakawa T, Hakeda Y, Koval A, Sodam B, Bevis PJ, Moser AJ, Lai FA, Epstein S, Troen BR, Kumegawa M, Zaidi M (1999) CD38/ADP-ribosyl cyclase: A new role in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 146:1161-1172
- (55) Okazaki R, Toriumi M, Fukumoto S, Miyamoto M, Fujita T, Tanaka K, Takeuchi Y (1999) Thiazolidinediones inhibit osteoclast-like cell formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* 140:5060-5065

- (56) Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, Matsuzaki K, Tsurukai T, Itoh K, Nakagawa N, Yasuda H, Goto M, Tsuda E, Higashio K, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T (1999) Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF- κ B ligand. *Bone* 25:517-523
- (57) Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G (1999) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J Biomed Mater Res* 45:140-147
- (58) Ilvesaro J, Vaananen K, Tuukkanen J (2000) Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res* 15:919-926.
- (59) Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. (1985) Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at osteoclast ruffled border. *J Cell Biol.* 101:2210-2222.
- (60) Inoue M, Yoshida H, Akisaka T (1999) Visualization of acidic compartments in cultured osteoclasts by use of an acidotropic amine as a marker for low pH. *Cell Tissue Res* 298:527-537.
- (61) Laitala-Leinonen T, Lowik C, Papapoulos S, Vaananen HK (1999) Inhibition of intravacuolar acidification by antisense RNA decreases osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *J Cell Sci* 112:3657-3666.
- (62) Shioi J, Naito S, Ueda T. (1989) Glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex and electrochemical potential difference of proton across the membrane. *Biochem J.* 258:499-504.
- (63) Tabb JS, Kish PE, Van Dyke R, Ueda T. (1992) Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J Biol Chem.* 267:15412-15418.
- (64) Hartinger J, Jahn R. (1993) An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 268:23122-23127.
- (65) Maycox PR, Deckwerth T, Hell JW, Jahn R. (1988) Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem.* 263:15423-15428.
- (66) Hell JW, Maycox PR, Stadler H, Jahn R. (1988) Uptake of GABA by rat brain synaptic vesicles isolated by a new procedure. *EMBO J.* 7:3023-3029.

- (67) Hell JW, Maycox PR, Jahn R. (1990) Energy dependence and functional reconstitution of the gamma-aminobutyric acid carrier from synaptic vesicles. *J Biol Chem.* 265:2111-2117
- (68) Thomas-Reetz A, Hell JW, During MJ, Walch-Solimena C, Jahn R, De Camilli P. (1993) A gamma-aminobutyric acid transporter driven by a proton pump is present in synaptic-like microvesicles of pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5317-5321.
- (69) Mellman I (1992) The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J. exp. Biol.* 172: 39-45.
- (70) Presley JF, Mayor S, Dunn KW, Johnson LS, McGraw TE, Maxfield FR. (1993) The End2 mutation in CHO cells slows the exit of transferrin receptors from the recycling compartment but bulk membrane recycling is unaffected. *J Cell Biol* 122:1231-1241.
- (71) Presley JF, Mayor S, McGraw TE, Dunn KW, Maxfield FR. (1997) Bafilomycin A1 treatment retards transferrin receptor recycling more than bulk membrane recycling. *J Biol Chem.* 272:13929-13936.
- (72) Johnson LS, Dunn KW, Pytowski B, McGraw TE. (1993) Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol Biol Cell* 4:1251-1266.
- (73) Chapman RE, Munro S. (1994) Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* 13:2305-2312.
- (74) Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem.* 269:21-24.
- (75) Tycko B, Maxfield FR (1982) Rapid acidification of endocytotic vesicles containing α_2 -macroglobulin. *Cell* 28: 643-651.
- (76) Zen K, Biwersi J, Periasamy N, Verkman AS (1992) Second messengers regulate endosomal acidification in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 119: 99-110.
- (77) Siegel MS, Isacoff EY (1997) A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* 19:735-741.
- (78) Gene Targeting. A Practical Approach. Editor: Joyner, A.L. IRL Press at Oxford University Press (Oxford, New York, Tokyo) (1993).

- (79) Brandt S, Jentsch TJ (1995) ClC-6 and ClC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. *FEBS Letters* 377:15-20.
- (80) Kornak U, Bosl MR, Kubisch C. (1999) Complete genomic structure of the CLCN6 and CLCN7 putative chloride channel genes. *Biochim Biophys Acta* 1447:100-106.
- (81) Reimer RJ, Fon EA, Edwards RH. (1998) Vesicular neurotransmitter transport and the presynaptic regulation of quantal size. *Curr Opin Neurobiol.* 8:405-412.
- (82) Gasnier B. (2000) The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* 82:327-337.
- (83) Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, Miyawaki A, Mikoshiba K, Marumo F, Sasaki S. (1994) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron.* 12:597-604.
- (84) Borsani G, Rugarli EI, Tagliafata M, Wong C, Ballabio A. (1995) Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics.* 27:131-141.
- (85) Sterrer S, Henco K. (1997) Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) - a highly sensitive method to analyze drug/target interactions. *J Recept Signal Transduct Res.* 17:511-520
- (86) Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K. (1999) Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13756-13561.
- (87) Palo K, Mets U, Jager S, Kask P, Gall K (2000) Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophys J* 79:2858-2866.
- (88) Schaertl S, Meyer-Almes FJ, Lopez-Calle E, Siemers A, Kramer J (2000) A novel and robust homogeneous fluorescence-based assay using nanoparticles for pharmaceutical screening and diagnostics. *J Biomol Screen* 5:227-238.
- (89) Karlsson R. (1994) Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface-immobilized receptors. *Anal Biochem.* 221:142-151.
- (90) Beerheide W, Bernard HU, Tan YJ, Ganesan A, Rice WG, Ting AE. (1999) Potential drugs against cervical cancer: zinc-ejecting inhibitors of the human papillo-

mavirus type 16 E6 oncoprotein. J Natl Cancer Inst. 91:1211-1220.

- (91) Deckert F, Legay F. (2000) Development and validation of an IL-6 immuno-receptor assay based on surface plasmon resonance. J Pharm Biomed Anal. 23:403-412.
- (92) Frostell-Karlsson A, Remaeus A, Roos H, Andersson K, Borg P, Hamalainen M, Karlsson R. (2000) Biosensor analysis of the interaction between immobilized human serum albumin and drug compounds for prediction of human serum albumin binding levels. J Med Chem. 43:1986-1992.
- (93) Markgren PO, Hamalainen M, Danielson UH. (2000) Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. Anal Biochem. 2000 Mar 1;279(1):71-8.
- (94) Williams C. (2000) Biotechnology match making: screening orphan ligands and receptors. Curr Opin Biotechnol 11:42-46.
- (95) Van Noorden CJ, Vogels IM, Everts V, Beertsen W. (1987) Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. Histochem J 19:483-487.
- (96) Xia L, Kilb J, Wex H, Li Z, Lipyansky A, Breuil V, Stein L, Palmer JT, Dempster DW, Bromme D (1999) Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. Biol Chem. 1999 Jun;380(6):679-87.

Patentansprüche:

1. Nukleinsäuresequenz, die für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
2. Nicht-menschlicher Säuger, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die für ClC-3, ClC-4, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
3. Nicht-menschlicher Säuger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich die für ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb und/oder ClC-5 kodierende(n) Nukleinsäuresequenz(en) durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist.
4. Zelllinie, die einen oder mehrere der Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nur vermindert exprimiert.
5. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-7, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-6, exprimiert.
6. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-3, nicht aber die Chloridkanäle ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, exprimiert.

7. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-4, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-5, ClC-6 und ClC-7, exprimiert.
8. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Chloridkanal ClC-6, nicht aber die Chloridkanäle ClC-3, ClC-4, ClC-5 und ClC-7, exprimiert.
9. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für ein Protein aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere der Chloridkanäle zu inhibieren.
10. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-7 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-7 zu inhibieren.
11. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die

für ClC-3 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-3 zu inhibieren.

12. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-4 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-4 zu inhibieren.
13. Verwendung eines genetisch veränderten, nicht-menschlichen Säugers, dessen Keim- und somatische Zellen für Proteine aus der Gruppe bestehend aus den Chloridkanälen ClC-1, ClC-2, ClC-Ka, ClC-Kb, ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und ClC-7 kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, wobei eine oder mehrere dieser Nukleinsäuresequenzen gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Nukleinsäuresequenz, nicht jedoch die für ClC-6 kodierende Sequenz, durch Mutation, Trunkation und/oder ganz oder teilweise Deletion verändert ist, zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-6 zu inhibieren.
14. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 5 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-7 zu inhibieren.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zum Identifizieren und Testen von Wirkstoffen zur Behandlung von Osteoporose, Morbus Paget.

16. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 6 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-3 zu inhibieren.
17. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 7 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-4 zu inhibieren.
18. Verwendung einer Zelllinie nach Anspruch 8 zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, den Chloridkanal ClC-6 zu inhibieren.
19. Verwendung nach den Ansprüchen 14 und 16 bis 18 zum Identifizieren und Testen von Wirkstoffen, die als Psychopharmaka geeignet sind.
20. Verfahren zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, einen oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7 zu inhibieren, bei dem man
 - a) an Zellen nach den Ansprüchen 5 bis 8 den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,
 - b) die Zellen mit einer Substanz in Kontakt bringt und
 - c) an den Zellen erneut den luminalen pH-Wert der den Kanal exprimierenden Kompartimente und/oder die Spannung über die den Kanal umschliessende Membran mißt,wobei der Unterschied zwischen dem pH-Wert und/oder der Membranspannung vor und nach Zugabe der Substanz die Aktivität der Substanz bestimmt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man den pH-Wert durch Akkumulation von Substanzen in Kompartimenten mit einem bestimmten pH-Wert oder Nachweis von Indikatorsubstanzen, die bei pH-abhängigen Reaktionen in den Kompartimenten gebildet werden, mißt.
22. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die Spannung durch Verwendung Spannungs-sensitiver Farbstoffe oder protein-kodierter Spannungssensoren mißt.
23. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Osteoporose und Morbus Paget.
24. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4 ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Erkrankungen aus der Gruppe bestehend aus neurologischen und neuromuskulären Erkrankungen sowie anderen Nervenkrankheiten.
25. Verwendung von Substanzen, die den Chloridkanal ClC-3, ClC-4 ClC-6 und/oder ClC-7 ganz oder teilweise inhibieren, zur Herstellung von Psychopharmaka.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Testsystem zur Identifizierung und zum Testen von Wirkstoffen, die auf die synaptische Transmission wirken (Wirkstoffe zur Behandlung neuronaler Erkrankungen), die die Endo-/Exozytose beeinflussen, die die Prozessierung von Proteinen beeinflussen und insbesondere von Wirkstoffen, die zur Behandlung der Osteoporose oder Morbus Paget, zur Behandlung neurologischer und neuromuskulärer Erkrankungen sowie anderer Nervenkrankheiten oder als Psychopharmaka verwendet werden können. Gegenstand der Erfindung ist ferner ein genetisch veränderter, nicht-menschlicher Säuger, bei dem ein oder mehrere Chloridkanäle aus der Gruppe bestehend aus ClC-3, ClC-4, ClC-6 und ClC-7 nicht oder nicht-funktionell exprimiert werden, sowie somatische Zelllinien, die von einem solchen Tier abgeleitet sind, sowie deren Verwendung zum Identifizieren und Testen von Substanzen, die geeignet sind, Chloridkanäle, insbesondere ClC-3, ClC-4, ClC-5, ClC-6 und/oder ClC-7, zu inhibieren.

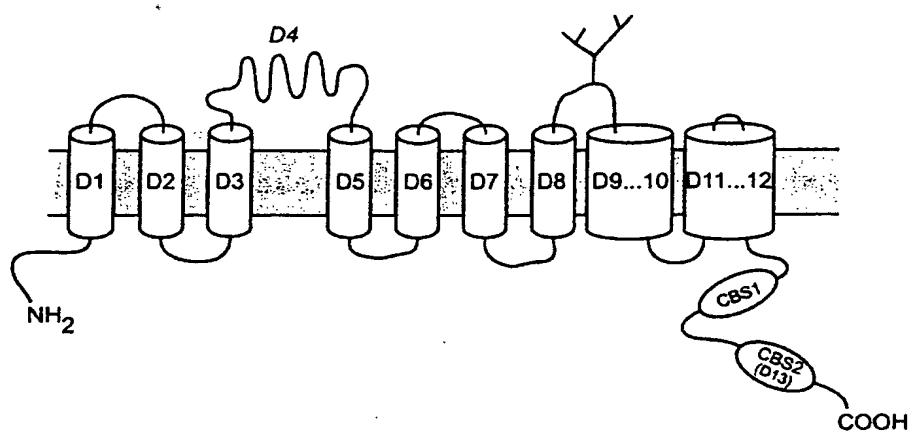


Fig. 1